



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

Estudio de variantes de *splicing* del receptor tipo II de TGF- β (T β RII) en células humanas y evaluación de su utilidad como biomarcadores de artritis reumatoidea

Alejandra Carrea

La Plata

Agosto de 2013

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

**Estudio de variantes de *splicing* del receptor tipo II de
TGF- β (T β RII) en células humanas y evaluación de su
utilidad como biomarcadores de artritis reumatoidea**

Alejandra Carrea

Director: Dr. Ricardo A. Dewey

A mi abuela Negra,
porque te llevo conmigo siempre
y me acompañás y guías en cada paso de mi vida.

Agradecimientos

Al Instituto de Investigaciones Biotecnológicas - Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH), CONICET-UNSAM, por haberme aceptado para trabajar en sus instalaciones.

A la Universidad Nacional de La Plata, por brindarme la posibilidad de hacer un doctorado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haber financiado con becas mis estudios de doctorado.

Al Dr. Ricardo Dewey, por haber confiado en mí, al darme un lugar en su laboratorio, y por dirigir mi trabajo de tesis.

Al Dr. Guillermo Docena, por haberme acompañado desde su rol de asesor académico.

Al Dr. Jorge Velasco Zamora, por su colaboración en parte de este trabajo.

A mi compañera desde los inicios, Tania, por todo lo que compartimos, por toda su ayuda, por sus enseñanzas, acompañamiento y apoyo. Fuiste muy importante en este trayecto de mi vida y eso estará conmigo para siempre. ¡Gracias!

A mi otra gran compañera, Milagros, porque con su carácter tranquilo y alegría me ayudó a parar cuando fue necesario para volver a empezar, luego, con más fuerzas.

A mis compañeras temporarias, Inés y Úrsula. Inés aportó mucho a mi crecimiento y desarrollo durante el tiempo que compartimos y Úrsula, con su frescura, renovó el aire de mis últimos días en el lab.

Al otro lado de la UB6, Seba, Mariana, Vale, Melina, Marisol y Luján, porque con su “barullo cotidiano” hicieron que nunca me sintiera sola, ¡aun cuando estaba sola! Aclaro, por las dudas, que este barullo del que les hablo era un barullo agradable que me hacía sentir en familia.

A Mati, Julia, Lis, el primo, Rubén y todo UB6, por tantas charlas entre mates que me ayudaron a seguir adelante.

A todos los demás integrantes del INTECH, porque cada uno desde su lugar colaboró para que hoy yo llegue al final de esta meta.

A Gustavo, Marcos, Ricardo, Elisa, Darío, Franco, Marian, Mauri y Mariana, por los viajes.

A los “platenses intechianos”, Marian, Fede, Mauri, Vale, Ailín, Aldana, Mariana y Mica, por hacer más llevaderos los kilómetros viajados compartiendo tantos litros de mate y horas de charlas. Todavía nos debemos el: ¿y si seguimos de largo hoy?

A mis compañeros de docencia, porque en momentos clave siempre hubo alguno con un buen consejo para darme. Quiero dar gracias especiales, en este caso, a Ceci Muglia.

A mi familia y amigos, por entender las ausencias, por acompañarme, por escucharme, por alentarme, por estar.

A Pedro, por todo lo que hizo por mí en este tiempo. ¡Llegamos al final, juntos!

Índice general

<i>Introducción</i>	16
1. Factor de crecimiento transformante β	17
1. 1. Isoformas, estructura y activación de TGF- β	17
1. 2. Receptores de TGF- β	18
1. 3. Vías de señalización de TGF- β	19
1. 4. Variantes de <i>splicing</i> de T β RII	21
1. 5. Receptores mutantes, receptores solubles recombinantes y solubles endógenos de TGF- β	22
1. 6. Regulación del sistema inmune por TGF- β	23
1. 6. 1. Efectos sobre linfocitos T	23
1. 6. 2. Efectos sobre linfocitos B	24
1. 6. 3. Efectos sobre células NK	25
1. 6. 4. Efectos sobre monocitos/macrófagos	25
1. 6. 5. Efectos sobre granulocitos	25
2. Artritis reumatoidea	26
2. 1. Epidemiología y etiología	26
2. 2. Patología y características clínicas	27
2. 3. Clasificación, diagnóstico y evaluación de la actividad de la AR	27
2. 4. Tratamientos y evaluación de la respuesta terapéutica	31
2. 5. Remisión de la AR	32
3. TGF-β y AR	33
3. 1. Efectos de TGF- β sobre leucocitos en AR	33
3. 2. Mecanismos de acción de TGF- β en AR	34
4. Objetivos	36
4. 1. Objetivo general	36
4. 2. Objetivos específicos	36
<i>Materiales y Métodos</i>	37
1. Materiales	38
1. 1. Cepa bacteriana y plásmidos	38
1. 2. Líneas celulares y cultivos primarios	38
1. 3. Muestras de pacientes con artritis reumatoidea y de voluntarios sanos	39
1. 4. Enzimas	40

1. 5. Anticuerpos y citoquinas	40
2. Métodos	41
2. 1. Procedimientos microbiológicos	41
2. 1. 1. Preparación de bacterias competentes químicas	41
2. 1. 2. Transformación de bacterias competentes químicas	41
2. 2. Técnicas de biología molecular	42
2. 2. 1. Extracción de ARN	42
2. 2. 2. Generación de ADN complementario (ADNc)	42
2. 2. 3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	42
2. 2. 3. 1. <i>RT-PCR</i>	42
2. 2. 3. 2. <i>RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)</i>	42
2. 2. 4. Electroforesis en geles de agarosa	43
2. 2. 5. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción	43
2. 2. 6. Generación de plásmidos recombinantes	43
2. 2. 7. Secuenciación de fragmentos de ADN	43
2. 2. 8. Minipreparación de ADN plasmídico (miniprep)	44
2. 2. 9. Preparación de ADN plasmídico en gran escala (maxipreparación)	44
2. 2. 10. Obtención de suero humano	44
2. 2. 11. Obtención, cuantificación y concentración de proteínas	44
2. 2. 12. Inmunoprecipitación	44
2. 2. 13. Electroforesis en geles de poliacrilamida	45
2. 2. 14. <i>Western-Blot</i>	45
2. 2. 15. Adquisición de imágenes de geles de agarosa y acrilamida y revelado y adquisición de imágenes de membranas de <i>western-blot</i>	46
2. 3. Procedimientos con cultivos celulares eucariotas	46
2. 3. 1. Aislamiento de leucocitos de sangre periférica humana	46
2. 3. 1. 1. <i>Separación de células sanguíneas</i>	46
2. 3. 1. 2. <i>Inmunoseparación magnética de subpoblaciones de células mononucleares de sangre periférica</i>	46
2. 3. 1. 3. <i>Separación de linfocitos totales y de monocitos a partir de células mononucleares de sangre periférica mediante adhesión diferencial al plástico</i>	47
2. 3. 2. Generación de líneas celulares linfoblastoides humanas inmortalizadas con el virus de Epstein-Barr (EBV-LCL)	47
2. 3. 3. Producción de vectores lentivirales	47
2. 3. 4. Titulación de los sobrenadantes virales	48
2. 3. 5. Transducción de la línea celular A549 con vectores lentivirales	48
2. 3. 6. Determinación de viabilidad y proliferación celular: ensayo MTT	48
2. 3. 7. Citometría de flujo	49
2. 4. Estadística	49
Resultados	50

<i>-Capítulo 1-</i>	51
Caracterización de una nueva variante de <i>splicing</i> de TβRII humano	51
1. Determinación, y análisis <i>in silico</i> , de la secuencia de la nueva variante de <i>splicing</i> de TβRII	52
2. Sobreexpresión y detección de la nueva isoforma de TβRII en sobrenadantes de células A549	55
3. Análisis funcional de seTβRII	57
<i>-Capítulo 2-</i>	64
Caracterización de un nuevo mutante del receptor TβRIIB	64
1. Sobreexpresión del nuevo mutante de TβRIIB en células A549	65
2. Análisis funcional de TβRIIBΔc	65
<i>-Capítulo 3-</i>	69
Evaluación del perfil de ARNm de las distintas variantes de TβRII en células humanas y de su utilidad como biomarcadores de artritis reumatoidea	69
1. Evaluación de los niveles de ARNm de las distintas variantes de TβRII en líneas celulares	70
2. Evaluación de los niveles de ARNm de las distintas variantes de TβRII en poblaciones leucocitarias	71
3. Evaluación de correlaciones entre los niveles de ARNm de las distintas variantes de TβRII y las determinaciones clínicas de la AR	81
<i>Discusión</i>	91
<i>Conclusiones y Perspectivas</i>	104
1. Conclusiones	105
2. Perspectivas	105
<i>Referencias bibliográficas</i>	107
<i>Patentes</i>	121

<i>Anexos</i>	123
1. Medios de cultivo	124
2. <i>Buffers</i> y soluciones	124
3. Kits comerciales	128
4. Equipos	128
5. Programas informáticos	129

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de complejos latentes de TGF- β .	18
Figura 2. Vía de señalización de TGF- β .	20
Figura 3. Efectos pleiotrópicos de TGF- β sobre leucocitos.	26
Figura 4. Comparación de una articulación sinovial normal versus una articulación sinovial en AR.	27
Figura 5. Representación de las 28 articulaciones empleadas en la determinación del índice DAS28.	30
Figura 6. Representación esquemática de las distintas variantes de T β RII y de los sitios de pegado de los <i>primers</i> utilizados en RT-PCR.	52
Figura 7. Alineamiento de nucleótidos de T β RIIDN, T β RIIB Δ c y del nuevo producto amplificado por RT-PCR.	53
Figura 8. Alineamiento de aminoácidos de T β RIIDN, T β RIIB Δ c y del nuevo producto amplificado por RT-PCR.	54
Figura 9. Esquema de los vectores lentivirales usados en este trabajo.	56
Figura 10. Sobreexpresión de seT β RII en células A549.	57
Figura 11. Efecto de seT β RII en ensayo MTT con TGF- β 1.	59
Figura 12. Efecto de seT β RII sobre la regulación de la expresión de citoquinas ejercida por TGF- β 1.	60
Figura 13. Efecto de seT β RII en ensayo MTT con TGF- β 2.	61
Figura 14. Representación esquemática de los sitios de pegado de los <i>primers</i> utilizados en RT-qPCR.	62
Figura 15. Análisis por RT-qPCR de los niveles relativos de los ARNm de las variantes de <i>splicing</i> de T β RII en células A549 transducidas con Lt-se β TRII.	63
Figura 16. Sobreexpresión de T β RIIB Δ c en células A549.	65
Figura 17. Efecto de T β RIIB Δ c en ensayo MTT con TGF- β 1.	66
Figura 18. Efecto de T β RIIB Δ c en ensayo MTT con TGF- β 2.	67

Figura 19. Análisis por RT-qPCR de los niveles relativos de los ARNm de las variantes de <i>splicing</i> de T β RII en células A549 transducidas con Lt-T β RIIB Δ c.	68
Figura 20. Perfiles de ARNm de las variantes de <i>splicing</i> de T β RII en líneas celulares y en cultivo primario de hASC.	70
Figura 21. Análisis por RT-qPCR de los niveles relativos de los ARNm de las variantes de <i>splicing</i> de T β RII en líneas celulares.	71
Figura 22. Pureza de las subpoblaciones sanguíneas aisladas.	72
Figura 23. Perfiles de ARNm de las variantes de <i>splicing</i> de T β RII en subpoblaciones leucocitarias humanas.	73
Figura 24. Diagramas de citometría de flujo representativos de las subpoblaciones leucocitarias aisladas.	74
Figura 25. Análisis por RT-qPCR de los niveles relativos de los ARNm de las variantes de <i>splicing</i> de T β RII en granulocitos de voluntarios sanos.	75
Figura 26. Análisis por RT-qPCR de los niveles relativos de los ARNm de las variantes de <i>splicing</i> de T β RII en linfocitos de voluntarios sanos.	76
Figura 27. Análisis por RT-qPCR de los niveles relativos de los ARNm de las variantes de <i>splicing</i> de T β RII en monocitos de voluntarios sanos.	77
Figura 28. Análisis por RT-qPCR de los niveles relativos de los ARNm de las variantes de <i>splicing</i> de T β RII en granulocitos de voluntarios con AR.	78
Figura 29. Análisis por RT-qPCR de los niveles relativos de los ARNm de las variantes de <i>splicing</i> de T β RII en linfocitos de voluntarios con AR.	79
Figura 30. Análisis por RT-qPCR de los niveles relativos de los ARNm de las variantes de <i>splicing</i> de T β RII en monocitos de voluntarios con AR.	80
Figura 31. Correlaciones positivas entre las abundancias relativas de los ARNm de TR β II y TR β IIIB en monocitos y las determinaciones clínicas n° de articulaciones doloridas y n° de articulaciones inflamadas.	83
Figura 32. Correlaciones positivas entre las abundancias relativas de los ARNm de TR β II y TR β IIIB en monocitos y el índice DAS28.	84
Figura 33. Correlación entre las abundancias relativas del ARNm de seTR β II en linfocitos y el parámetro analítico ESD.	84

Figura 34. Correlaciones negativas entre las abundancias relativas del ARNm de TR β IIB en granulocitos y las determinaciones clínicas HAQ y VAS médico y las abundancias relativas del ARNm de seTR β II en granulocitos y DAS28. **85**

Figura 35. Comparación de los niveles de los ARNm de T β RII y T β RIIB de monocitos entre voluntarios sanos y enfermos. **87**

Figura 36. Cálculo para identificar y clasificar la AR según niveles del ARNm de T β RIIB en monocitos. **89**

Índice de tablas

Tabla 1. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de aminoácidos de la nueva variante de <i>splicing</i> de TβRII.	55
Tabla 2. Pureza de linfocitos y monocitos de voluntarios sanos y de voluntarios con AR.	74
Tabla 3. Datos y determinaciones clínicas y bioquímicas de los voluntarios.	82
Tabla 4. Correlaciones entre las distintas variables determinadas en los pacientes.	86
Tabla 5. Criterios de clasificación de la actividad de la AR según DAS28.	86

Abreviaciones

ACR: colegio americano de reumatología
anti-PCC: antipéptidos cíclicos citrulinados
AR: artritis reumatoidea
ARA: asociación americana de reumatismo
BMP: proteínas morfogénicas óseas
BSA: seroalbúmina bovina
CMV: citomegalovirus
CRP: proteína C reactiva
Ct: ciclo umbral
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DAS28: marcador de la actividad de la enfermedad mediante la cuenta de 28 articulaciones
DMARD: drogas antirreumáticas modificadoras de la enfermedad
EBV: virus de Epstein-Barr
EGFP: proteína fluorescente verde mejorada
EGM: evaluación global del médico
EGP: evaluación global del paciente
ESD: eritrosedimentación
EULAR: liga europea contra el reumatismo
FITC: isotiocianato de fluoresceína
FR: factor reumatoideo
FSC: dispersión frontal
GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDF: factores de diferenciación del crecimiento
GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
HAQ: cuestionario de evaluación de la salud
hASC: células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano
HIV: virus de la inmunodeficiencia humana
HRP: peroxidasa de rábano picante
IFN- γ : interferón γ
IFP: interfalángicas proximales

Ig: inmunoglobulina
IL: interleuquina
LAP: péptido de latencia asociado
LCL: línea celular linfoblastoide
LLC: complejo latente grande
LTBP: proteínas latentes de unión a TGF- β
M-MLV: virus de la leucemia murina Moloney
MAP: proteínas activadas por mitógenos
MCF: metacarpofalángicas
MIS: sustancia inhibidora de Müllerian
MMP: metaloproteasas de la matriz
MOI: multiplicidad de infección
MTF: metatarsofalángicas
MTX: metotrexato
NAD: número de articulaciones doloridas
NAI: número de articulaciones inflamadas
NK: *natural killer*
NSAID: drogas antiinflamatorias no esteroideas
PBMC: células mononucleares de sangre periférica
PE: ficoeritrina
PCP: proteína clorofila peridina
PEG: polietilenglicol
PIC: cóctel de inhibidores de proteasas
PMA: acetato de forbol miristato
SBE: elementos de unión a Smad
SFB: suero fetal bovino
SH: suero humano
SLC: complejo latente pequeño
SSC: dispersión lateral
TGF- β : factor de crecimiento transformante β
T β RI/II/III: receptor tipo I/II/III de TGF- β
T β RIIDN: T β RII dominante negativo
TNF- α : factor de necrosis tumoral α

UT: unidades de transducción

VAS: escala analógica visual

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

VS: voluntario sano

VSV-G: glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular

Introducción

1. Factor de crecimiento transformante β

El factor de crecimiento transformante beta o TGF- β (por sus siglas en inglés, *transforming growth factor*- β) es una citoquina pleiotrópica, purificada inicialmente a partir de placenta y de plaquetas humanas (Frolik, C. A. *et al.*, 1983; Assoian, R. K. *et al.*, 1983), que tiene efectos sobre la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia celulares. Estos efectos afectan múltiples procesos biológicos como el desarrollo embrionario, la carcinogénesis, fibrosis, cicatrización de heridas y las respuestas inmunitarias (Massagué, J., 1990). TGF- β es uno de los más de 40 miembros que forman la superfamilia de TGF- β , integrada además por activinas, inhibinas, BMP (por sus siglas en inglés, *bone morphogenetic proteins*), GDF (por sus siglas en inglés, *growth differentiation factors*), MIS (por sus siglas en inglés, *Müllerian inhibiting substance*), *Nodal* y *leftys* (Chang, H. *et al.*, 2002).

1. 1. Isoformas, estructura y activación de TGF- β

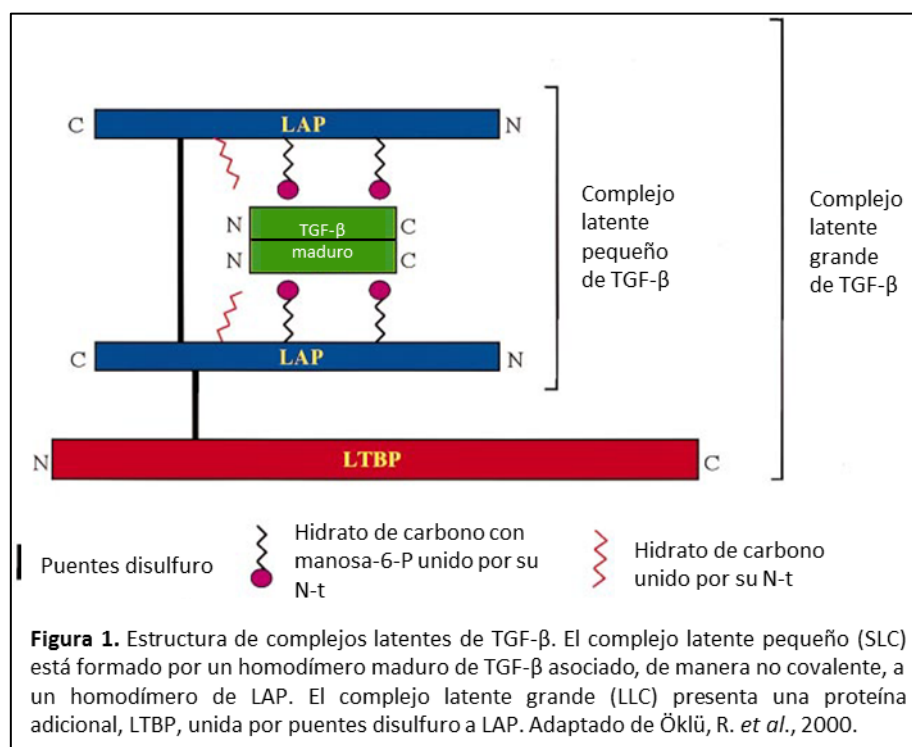
En mamíferos se han identificado tres isoformas de TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3; codificadas por genes diferentes. Las tres isoformas están presentes de manera abundante durante el desarrollo y muestran patrones de expresión temporal y espacial distintos y superpuestos. Cada una cumple un rol diferente, cuya naturaleza depende del tipo celular, de su estado de diferenciación, de las condiciones de crecimiento y de otros factores de crecimiento presentes (Govinden, R. *et al.*, 2003). TGF- β 1 es la isoforma más común, se expresa en células y tejidos normales y malignos y su actividad biológica e interacción con receptores celulares de superficie han sido estudiadas exhaustivamente.

Los fenotipos resultantes del *knockout* de las tres isoformas de mamíferos son muy diferentes. Ratones *knock-out* para TGF- β 1 presentan una enfermedad similar a la autoinmune (Schull, M. M. *et al.*, 1992). Ratones *knock-out* para TGF- β 2 exhiben mortalidad perinatal y severos defectos del desarrollo (Sanford, L. P. *et al.*, 1997). Ratones que carecen de TGF- β 3 mueren dentro de las 20 horas luego del nacimiento, con un fenotipo caracterizado por paladar hendido y desarrollo pulmonar defectivo (Kaartinen, V. *et al.*, 1995). Esto indica que estos ligandos tienen actividades específicas que no pueden ser compensadas con las de los otros miembros de la familia (Sanford, L. P. *et al.*, 1997).

La forma bioactiva de los TGF- β , de 25 kDa, consiste en dos cadenas peptídicas maduras unidas por puentes disulfuro. Generalmente, los TGF- β se encuentran como homodímeros (TGF- β 1.1, TGF- β 2.2, TGF- β 3.3), aunque también se han identificado moléculas heterodiméricas en extractos óseos bovinos (TGF- β 1.2 y TGF- β 2.3) (Ogawa, Y. *et al.*, 1992).

Inicialmente, los TGF- β son sintetizados por la célula como complejos latentes, biológicamente inactivos. En el complejo latente pequeño o SLC (por sus siglas en inglés, *small latent complex*) un dímero de TGF- β maduro está asociado, de manera no covalente, a un dímero de

propéptidos llamado LAP (por sus siglas en inglés, *latency associated peptide*) (Figura 1). LAP convierte a TGF- β en una molécula latente al impedir la unión a sus receptores (Wakefield, L. M. *et al.*, 1988). Además, LAP es necesario para su correcta secreción, evita la unión de TGF- β a receptores de superficie celular ubicuos y mantiene disponible un gran reservorio extracelular de TGF- β para usos futuros (Govinden, R. *et al.*, 2003). El complejo latente pequeño puede ser secretado como tal o formando parte del complejo latente grande o LLC (por sus siglas en inglés, *large latent complex*). En el LLC una de las cadenas de LAP se encuentra unida por puentes disulfuro a un miembro de la familia de proteínas de alto peso molecular llamadas LTBP (por sus siglas en inglés, *latent TGF- β -binding proteins*) (Figura 1) (Miyazono, K. *et al.*, 1991). El complejo latente grande secretado, permanece asociado a la matriz extracelular a través de la unión de LTBP a componentes de la matriz (Taipale, J. *et al.*, 1994).



La activación extracelular de estos complejos latentes de TGF- β es un proceso crítico en la regulación de las funciones de TGF- β *in vivo*. Los activadores incluyen proteasas (Taipale, J. *et al.*, 1994; Yu, Q. *et al.*, 2000; Ge, G. *et al.*, 2006), trombospondina-1 (Schultz-Cherry, S. *et al.*, 1993), especies reactivas de oxígeno (Barcellos-Hoff, M. H. *et al.*, 1996) e integrinas (Munger, J. S. *et al.*, 1999; Wipff, P. J. *et al.*, 2008). La liberación de TGF- β ocurre por degradación de LAP o de LTBP o por cambios conformacionales en el complejo latente (Horiguchi, M. *et al.*, 2012).

1. 2. Receptores de TGF- β

En células de mamíferos, la mayoría de las respuestas a TGF- β están mediadas por los receptores de superficie tipo I (T β RI) y tipo II (T β RII), los cuales se expresan en múltiples tipos

celulares y tejidos (Massagué, J. *et al.*, 1994). El clonado molecular de T β RI y T β RII, de 55 kDa y 70 kDa respectivamente, ha demostrado que son miembros de una familia de proteínas con una pequeña región extracelular rica en cisteínas, un dominio simple transmembrana y un dominio serina/treonina quinasa citoplasmático (Franzén, P. *et al.*, 1993, Lin, H. Y. *et al.*, 1992). Entre los dominios quinasa de T β RI y T β RII existe un 40 % de homología. Los receptores tipo I presentan, en la porción citoplasmática precedente al dominio quinasa, una región altamente conservada de 30 aminoácidos que se conoce como dominio GS, debido a que se trata de una secuencia rica en glicinas y serinas (Wrana, J. L. *et al.*, 1994a).

La eficiencia y especificidad de la unión de TGF- β al complejo receptor formado por T β RI y T β RII está definida, en parte, por el receptor de superficie accesorio conocido como betaglicano, receptor tipo III de TGF- β o T β RIII. Este receptor, un proteoglicano anclado a membrana de 100-280 kDa, se expresa de manera ubicua en casi todos los tipos celulares, puede unirse a las tres isoformas de TGF- β y presenta un dominio citoplasmático corto sin un motivo de señalización aparente (López-Casillas, F. *et al.*, 1991). Como se describirá más adelante, una de sus principales funciones es aumentar la afinidad de TGF- β 2 por T β RII (López-Casillas, F. *et al.*, 1993; Brown, C. B. *et al.*, 1999). Por otro lado, el dominio extracelular de T β RIII puede ser escindido proteolíticamente, lo que produce un receptor soluble, sT β RIII. Esta isoforma es capaz de antagonizar los efectos del receptor unido a membrana, aunque también se ha visto que en presencia de una baja concentración de TGF- β , sT β RIII puede favorecer la unión de TGF- β a T β RII (Gatza, C. E. *et al.*, 2010).

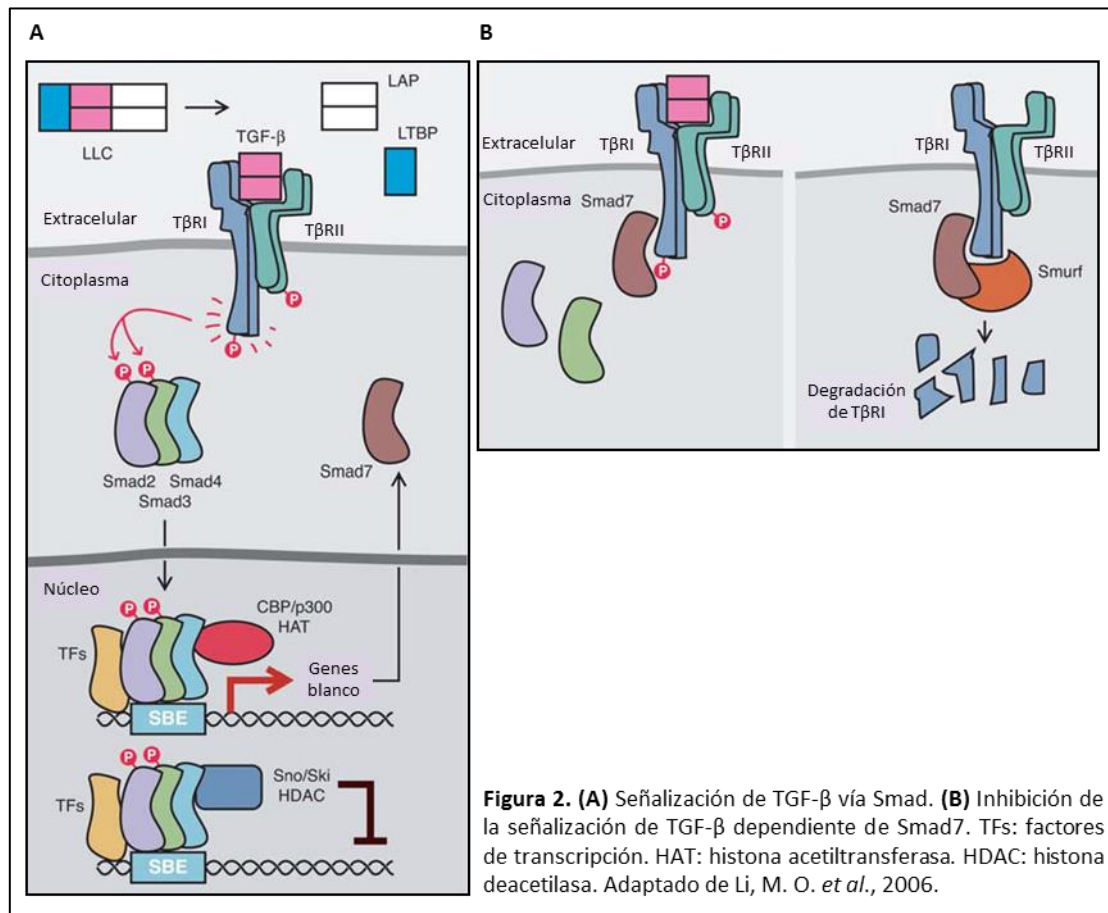
1. 3. Vías de señalización de TGF- β

Evidencias genéticas de células mutantes resistentes a la acción de TGF- β sugieren que tanto el receptor tipo I como el tipo II son requeridos para la señalización de TGF- β (Wrana, J. L. *et al.*, 1992). De hecho, TGF- β induce la formación de heterocomplejos de T β RI y T β RII (Wrana, J. L. *et al.*, 1992; Franzén, P. *et al.*, 1993), principalmente heterotetrámeros formados por dos moléculas de cada uno de los receptores (Yamashita, H. *et al.*, 1994).

Mediante mutagénesis sitio dirigida del ectodominio de T β RII se han identificado dos posibles regiones para la unión de TGF- β 1 al receptor. Una de las regiones es un parche hidrofóbico en la cara cóncava del dominio extracelular, mientras que la segunda es una estructura del tipo *finger 1 surface loop*. Finalmente, se demostró que para que se produzca la unión productiva entre las tres isoformas de TGF- β y el receptor son fundamentales aminoácidos presentes en la región *finger 1 surface loop*, en particular, la cisteína ubicada en la posición 71 (C71). Este aminoácido forma un puente disulfuro con C54, unión que se encuentra expuesta en la superficie del receptor, lo que le permitiría interactuar directamente con los ligandos (Guimond, A. *et al.*, 2002). Otros residuos de T β RII esenciales para que ocurra la unión con TGF- β son D55 y E142, que interaccionan a través de puentes de hidrógeno con los residuos

R94 y R25 del ligando, respectivamente (De Crescenzo, G. *et al.*, 2006; Baardsnes, J. *et al.*, 2009; Radaev, S. *et al.*, 2010).

T β RII es una quinasa constitutivamente activa que se encuentra autofosforilada. TGF- β 1 se une directamente a T β RII, T β RI es luego reclutado al complejo y es fosforilado por T β RII en su dominio GS (Wrana, J. L. *et al.*, 1994b; Cárcamo, J. *et al.*, 1995; Souchelnytskyi, S. *et al.*, 1996). A continuación, T β RI se asocia transitoriamente con proteínas R-Smad (R-Smad2 y R-Smad3) y las fosforila en sus extremos C-terminales ricos en serinas. Luego, cada R-Smad fosforilada se disocia del receptor y forma un complejo con Co-Smad4. Este complejo de proteínas Smad es translocado al núcleo donde, junto con otros factores de transcripción, se une a secuencias específicas en el ADN, denominadas SBE (por sus siglas en inglés, *Smad-binding elements*), para regular la transcripción de una gran cantidad de genes (Massagué, J. *et al.*, 2000; Shi, Y. *et al.*, 2003). Uno de los genes activados luego de esta señalización es el que codifica para I-Smad7. La expresión de esta proteína inhibe la señalización desencadenada por TGF- β 1, ya sea mediante competencia con R-Smad por la unión a T β RI (Suzuki, C. *et al.*, 2002) o mediante la formación de complejos con Smurf1, una ubiquitin ligasa E3, que desencadena la ubiquitinación y posterior degradación de los receptores de TGF- β (Ebisawa, K. *et al.*, 2001). Un esquema de esta vía de señalización se muestra en la Figura 2.



A diferencia de TGF- β 1 y TGF- β 3, TGF- β 2 parece tener un modo de activación de T β RII diferente ya que el receptor posee una afinidad intrínseca muy baja por esta isoforma (Lin, H. Y. *et al.*, 1995). La necesidad de un tercer receptor (T β RIII o betaglicano) para que las células respondan al TGF- β 2 ha sido descrita en distintos tipos celulares (Brown, C. B. *et al.*, 1999). T β RIII une a TGF- β 2 y lo presenta a T β RII luego de la oligomerización de ambos tipos de receptores (López-Casillas, F. *et al.*, 1993). Se ha demostrado que la baja afinidad de TGF- β 2 por T β RII se debe a la sustitución de tres aminoácidos. Mientras que TGF- β 1 y TGF- β 3 presentan R25, V92 y R94, residuos que contactan con T β RII y contribuyen significativamente a la afinidad de estas dos isoformas por el receptor, TGF- β 2 posee K25, I92 y K94 (De Crescenzo, G. *et al.*, 2006). Posteriormente, se confirmó que R25 y R94 son los responsables de la elevada afinidad de TGF- β 1 y TGF- β 3 por T β RII, mientras que V92 cumple un rol en la señalización celular (Baardsnes, J. *et al.*, 2009).

Además de activar la vía canónica de Smads, TGF- β también puede regular procesos celulares a través de vías intracelulares alternativas como la de quinasas MAP, GTPasas tipo Rho, fosfatidilinositol-3-quinasa, entre otras (Zhang, Y. E., 2009). Esto aumenta aún más la complejidad de la señalización de TGF- β .

Una correcta e ininterrumpida vía de señalización de TGF- β es indispensable para que el desarrollo embrionario y distintas funciones biológicas transcurran normalmente (Massagué, J., 1990). La ausencia de TGF- β o una sensibilidad alterada a la citoquina en algún tejido derivan en condiciones patológicas serias como mortalidad perinatal o posnatal temprana (Schull, M. M. *et al.*, 1992; Kulkarni, A. B. *et al.*, 1993), enfermedades autoinmunes (Kulkarni, A. B. *et al.*, 1993; Kulkarni, A. B. *et al.*, 1995) o cáncer (Derynck, R. *et al.*, 2001; Siegel, P. M. *et al.*, 2003). Asimismo, la producción excesiva de TGF- β se ha relacionado con acumulación de tejido fibroso cicatrizante (Huang, J. S. *et al.*, 2002), psoriasis (Li, A. G. *et al.*, 2004), glomerulonefritis (Reeves, W. B. *et al.*, 2000), fibrosis pulmonar y hepática (Kaminski, N. *et al.*, 2000), inmunosupresión inducida por tumor (de Visser, K. E. *et al.*, 1999) y metástasis (Derynck, R. *et al.*, 2001; Siegel, P. M. *et al.*, 2003).

1. 4. Variantes de *splicing* de T β RII

Se ha caracterizado funcionalmente una isoforma de T β RII que se une y señala directamente vía TGF- β 2, sin el requerimiento de T β RIII. Esta isoforma, llamada T β RIIB, es una variante producida por *splicing* alternativo de T β RII que resulta en la adición de 75 pb que codifican para 25 aminoácidos en la región N-terminal (dominio extracelular) del receptor maduro. Esta inserción produce, además, un intercambio de isoleucina por valina en el empalme del sitio de *splicing* entre las dos variantes del receptor (Hirai, R. *et al.*, 1996; Rotzer, D. *et al.*, 2001). Más recientemente, se ha informado que en ausencia de T β RIII, T β RIIB requiere del receptor tipo I para unir a TGF- β 2 (del Re, E. *et al.*, 2004).

Mientras que T β RII se expresa de manera ubicua en células humanas, se creía que la expresión del receptor T β RIIB en la superficie celular estaba restringida a células humanas relacionadas con la función ósea como osteoblastos fetales y células de osteosarcoma, a pesar de que el ARNm de esta variante de *splicing* también se había detectado en otros tipos celulares como en la línea derivada de carcinoma hepatocelular humano, Hep 3B, y en la línea derivada de neuroblastoma humano, IMR 32 (Rotzer, D. *et al.*, 2001). Sin embargo, en estudios posteriores se encontró que el receptor T β RIIB también se expresa en células epiteliales en algunas glándulas prostáticas humanas, mientras que su ARNm se detectó en distintas líneas celulares prostáticas humanas. Por otro lado, en este mismo estudio, se identificó otra variante de *splicing* de T β RII, denominada T β RIIC, que presenta 36 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal y que se localiza, principalmente, en células epiteliales y musculares de próstata humana (Konrad, L. *et al.*, 2007).

1. 5. Receptores mutantes, receptores solubles recombinantes y solubles endógenos de TGF- β

Para bloquear los efectos de la acción de TGF- β tanto *in vivo* como *in vitro*, se han utilizado anticuerpos neutralizantes (Hill, C. *et al.*, 2001) y oligonucleótidos antisentido (Maggard, M. *et al.*, 2001; Schlingensiepen, K. H. *et al.*, 2011), pero el empleo de un receptor T β RII modificado ha demostrado ser de suma utilidad. Este receptor mutante, que carece del dominio serina/treonina quinasa citoplasmático, funciona como dominante negativo (T β RIIDN). La sobreexpresión de T β RIIDN irrumpe, específicamente, la señalización mediada por TGF- β . De esta manera se puede estudiar el comportamiento de diversos tipos celulares en ausencia de la acción parácrina y autócrina de la citoquina (Chen, R. -H. *et al.*, 1993; Brand, T. *et al.*, 1993; Weiser, R. *et al.*, 1993; Fan, X. *et al.*, 2002). Si bien se conoce la acción del mutante T β RIIDN, se desconoce si la eliminación del dominio intracitoplasmático de T β RIIB produce efectos similares.

Otra alternativa para antagonizar los efectos de TGF- β , muy utilizada en estudios clínicos, está basada en el uso de una variante soluble de T β RII (sT β RII-Fc) (Isaka, Y. *et al.*, 1999; Muraoka, R. S. *et al.*, 2002; Yang, Y. *et al.*, 2002; Suzuki, E. *et al.*, 2004). Esta versión recombinante de T β RII consiste en el dominio extracelular del receptor fusionado a la región Fc de la inmunoglobulina humana IgG1 (Komesli, S. *et al.*, 1998; Smith, J. D. *et al.*, 1999). sT β RII-Fc tiene una afinidad muy alta por TGF- β 1 y TGF- β 3, hecho que permitió usarlo para dilucidar la unión de la distintas isoformas de TGF- β a sus receptores (del Re, E. *et al.*, 2004). *In vivo*, sT β RII-Fc presenta ciertas ventajas frente a otras moléculas pequeñas usadas para inhibir a TGF- β . Su alto peso molecular (~100 kDa) le confiere una vida media más larga que, junto a su elevada afinidad, aumentan su capacidad de secuestrar secreciones locales pequeñas de TGF- β (Russo, M. L. *et al.*, 2009).

Los receptores solubles de citoquinas constituyen una nueva generación de agentes terapéuticos con un tremendo potencial para su aplicación en una amplia variedad de enfermedades humanas. En general, muchos de ellos han demostrado ser seguros, bien tolerados por los pacientes y con efectos secundarios mínimos. Varias empresas farmacéuticas han desarrollado agentes terapéuticos basados en receptores solubles de citoquinas que están siendo ensayados en estudios clínicos. El más conocido en términos de éxito terapéutico y comercial es Etanercept, una proteína de fusión entre el receptor soluble de tipo II de TNF- α y la región Fc de la inmunoglobulina humana IgG1. Este antagonista de TNF- α fue el primer receptor soluble en recibir aprobación para uso en humanos (Moreland, L. W., 1999). Al igual que en sT β RII-Fc, la presencia del dominio Fc incrementa en gran medida la vida media de la proteína de fusión en plasma, lo que prolonga su actividad terapéutica y permite una purificación más económica mediante cromatografía de afinidad con proteína A/G.

Naturalmente, los receptores solubles de citoquinas se generan mediante distintos mecanismos tales como: escisión proteolítica de sus ectodominios (mencionado previamente en la generación de sT β RIII), *splicing* alternativo de los transcritos de ARNm, transcripción a partir de un gen diferente, liberación de receptores completos en vesículas tipo exosomas y escisión de receptores de membrana anclados a glicosilfosfatidilinositol. Estos receptores solubles regulan eventos inmunitarios e inflamatorios al funcionar como agonistas o antagonistas de la vía de señalización de la citoquina a la que se unen. Un conocimiento más profundo de los mecanismos moleculares que regulan la producción de receptores solubles de citoquinas y de las funciones de estos receptores permitirá mejorar la comprensión de la patogenia de diversas enfermedades y generar nuevas estrategias terapéuticas (Levine, S. J., 2004).

1. 6. Regulación del sistema inmune por TGF- β

La principal función de TGF- β en el sistema inmune es mantener la homeostasis mediante la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia de los linfocitos. Además, controla los procesos inflamatorios al regular la quimiotaxis, activación y supervivencia de linfocitos, células *natural killers* (NK), células dendríticas, macrófagos, mastocitos y granulocitos. La regulación ejercida por TGF- β depende del estado de diferenciación celular y de la presencia de citoquinas inflamatorias y de moléculas coestimuladoras. En conjunto, TGF- β inhibe el desarrollo de inmunopatologías contra autoantígenos o antígenos inofensivos sin comprometer las respuestas inmunitarias contra patógenos (Li, M. O. *et al.*, 2006).

En la Figura 3 se resumen los efectos que tiene esta citoquina sobre las distintas poblaciones de leucocitos.

1. 6. 1. Efectos sobre linfocitos T

TGF- β inhibe la proliferación de células T *naïve*, mientras que tiene un efecto mínimo sobre las células T activadas, hecho que se correlaciona con una baja expresión de T β RII en estas células (Cottrez, F. *et al.*, 2001). La inhibición de la proliferación de células T por TGF- β es un mecanismo importante para mantener la homeostasis de estas células y prevenir desórdenes linfoproliferativos.

TGF- β inhibe la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ en células T *helper* (Th) (Gorelik, L. *et al.*, 2002) y de linfocitos T CD8⁺ en linfocitos T citotóxicos (Ranges, G. E. *et al.*, 1987). La expresión de T β RIIDN bajo la acción del promotor CD4 bloquea la señalización de TGF- β en células T CD4⁺ y CD8⁺. Ratones con esta modificación desarrollan un fenotipo inflamatorio autoinmune asociado con la diferenciación de células T CD4⁺ en células Th1 o Th2 y, espontáneamente, sus linfocitos T CD8⁺ se activan y producen citoquinas efectoras (Gorelik, L. *et al.*, 2000).

Durante la expansión y diferenciación de células T, TGF- β promueve su supervivencia (Li, M. O. *et al.*, 2006).

Las células T supresoras o Treg suprimen las respuestas inmunitarias y mantienen la tolerancia inmunológica. Las Treg naturales son CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ (Fontenot, J. D. *et al.*, 2005) y comprenden un 5-10 % de las células T CD4⁺ periféricas (Sakaguchi, S., 2004). TGF- β 1 puede convertir células T CD4⁺ CD25⁻ en Treg *in vitro* (Chen, W. *et al.*, 2003).

Tanto células T activadas (Kehrl, J. H. *et al.*, 1986a) como Treg (Nakamura, K. *et al.*, 2001) expresan TGF- β 1. Este TGF- β 1 impide la activación de células T y el desarrollo de enfermedades inflamatorias.

1. 6. 2. Efectos sobre linfocitos B

TGF- β inhibe la proliferación de células B, induce apoptosis de células B inmaduras o en reposo y bloquea la activación de estas células (Li, M. O. *et al.*, 2006).

Un rol particular de TGF- β es promover la diferenciación de células plasmáticas secretoras de IgA (McIntyre, T. M. *et al.*, 1995). La inactivación condicional de la señalización de TGF- β en células B de ratón tiene como consecuencia un aumento de las inmunoglobulinas séricas, sin embargo, estos ratones están casi desprovistos de IgA (Cazac, B. B. *et al.*, 2000). Esto sugiere que, *in vivo*, TGF- β es un importante regulador de la tolerancia de las células B a los autoantígenos.

Las células B en reposo expresan ARNm de TGF- β 1 pero secretan bajas cantidades de la proteína. Sin embargo, luego de ser estimuladas producen grandes cantidades de TGF- β 1 (Kehrl, J. H. *et al.*, 1986b). Esto concuerda con el hecho de que bajas dosis de TGF- β 1 promueven la secreción de anticuerpos, mientras que altas dosis la inhiben (Snapper, C. M. *et al.*, 1993).

1. 6. 3. Efectos sobre células NK

TGF- β es un potente inhibidor de las funciones de las células NK al atenuar su actividad citolítica y la producción de IFN- γ (Rook, A. H. *et al.*, 1986; Bellone, G. *et al.*, 1995). También controla su homeostasis.

Las células NK serían una fuente importante de TGF- β 1 *in vivo* ya que, constitutivamente, producen las formas latente y activa de la citoquina (Gray, J. D. *et al.*, 1998).

1. 6. 4. Efectos sobre monocitos/macrófagos

En general, TGF- β estimula células en estado de reposo (monocitos), mientras que inhibe células activadas (macrófagos) (Ashcroft, G. S., 1999).

TGF- β recluta monocitos en zonas de heridas o inflamación a través de diferentes mecanismos: actúa como quimioatractor de monocitos (Wahl, S. M. *et al.*, 1987), induce moléculas de adhesión que permiten la unión de monocitos a la matriz extracelular e induce metaloproteasas de la matriz (MMP) que pueden disolver membranas vasculares y facilitar la trans migración de los monocitos (Wahl, S. M. *et al.*, 1993a). Además, potencia la inflamación en monocitos al inducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias como IL-1 e IL-6 (Wahl, S. M. *et al.*, 1987; Turner, M. *et al.*, 1990).

Una vez que los monocitos se diferenciaron a macrófagos TGF- β funciona, principalmente, como un inhibidor. Por ejemplo, limita su capacidad fagocítica al disminuir la expresión de receptores *scavenger* (Han, J. *et al.*, 2000) y reduce la fagocitosis de partículas recubiertas con IgG al disminuir la expresión de receptores de IgG en distintas células (Tridandapani, S. *et al.*, 2003).

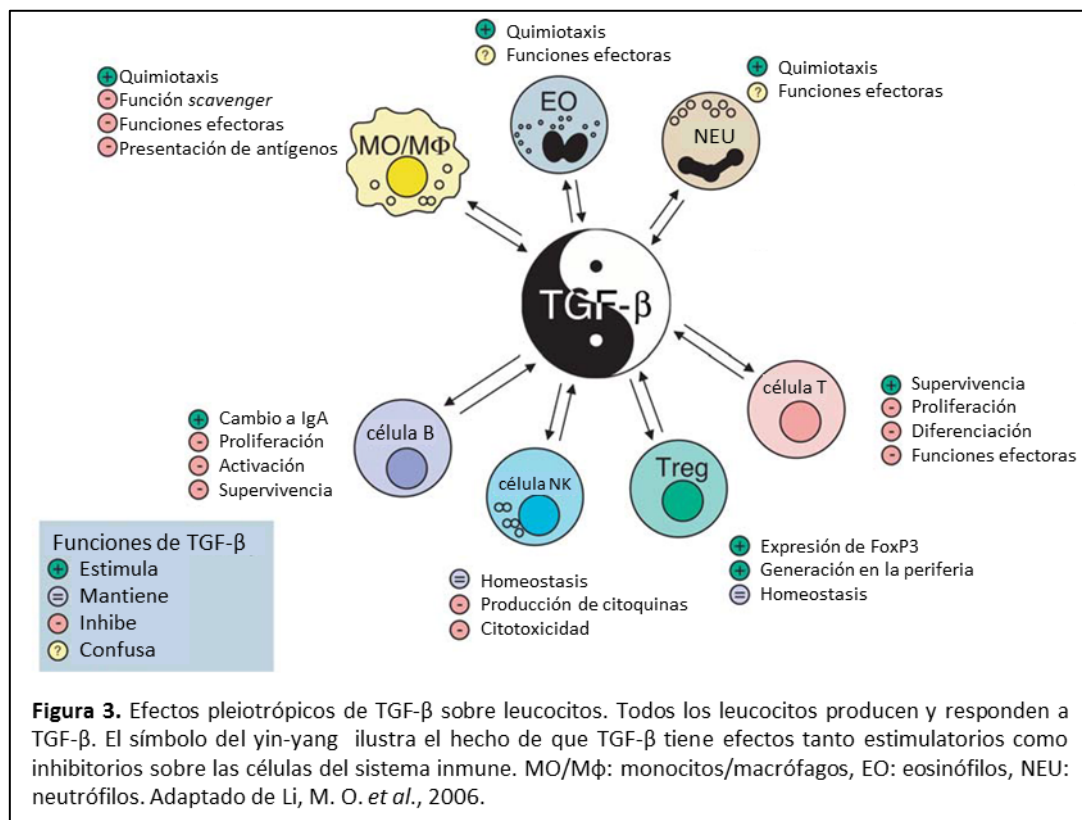
TGF- β también tiene un efecto inhibitorio sobre la función presentadora de antígenos y sobre la activación de macrófagos. El primer efecto sería importante para resolver una respuesta inmunitaria en curso al disminuir la estimulación de células T en el sitio de infección, mientras que el segundo serviría para terminar un proceso inflamatorio y para prevenir el desarrollo de inmunopatologías (Li, M. O. *et al.*, 2006).

1. 6. 5. Efectos sobre granulocitos

TGF- β es un potente quimioatractor de neutrófilos (Brandes, M. E. *et al.*, 1991a) y de eosinófilos humanos (Luttmann, W. *et al.*, 1998). Esta citoquina tendría un rol importante en el reclutamiento de células en los sitios de heridas o infección. La quimiotaxis de neutrófilos mediada por TGF- β sería un mecanismo de defensa importante del hospedador.

La regulación de la activación y de las funciones efectoras de los granulocitos por TGF- β es controvertida (Brandes, M. E. *et al.*, 1991a).

El TGF- β 1 derivado de neutrófilos sería relevante en los derrames sinoviales (Fava, R. A. *et al.*, 1991). El producido por eosinófilos estaría involucrado en fibrosis y en el remodelado de las vías aéreas en asma (Munitz, A. *et al.*, 2004).



2. Artritis reumatoidea

La artritis reumatoidea (AR) es una enfermedad autoinmune, inflamatoria y sistémica que se caracteriza por la inflamación crónica de las articulaciones periféricas con su consiguiente daño estructural y deterioro funcional (Brennan, F. *et al.* 2007). En el compromiso articular de la AR se observa una excesiva proliferación de células sinoviales, células presentadoras de antígenos y leucocitos, donde los linfocitos T y B son los principales efectores del proceso inflamatorio (Scrivo, R. *et al.*, 2007).

2. 1. Epidemiología y etiología

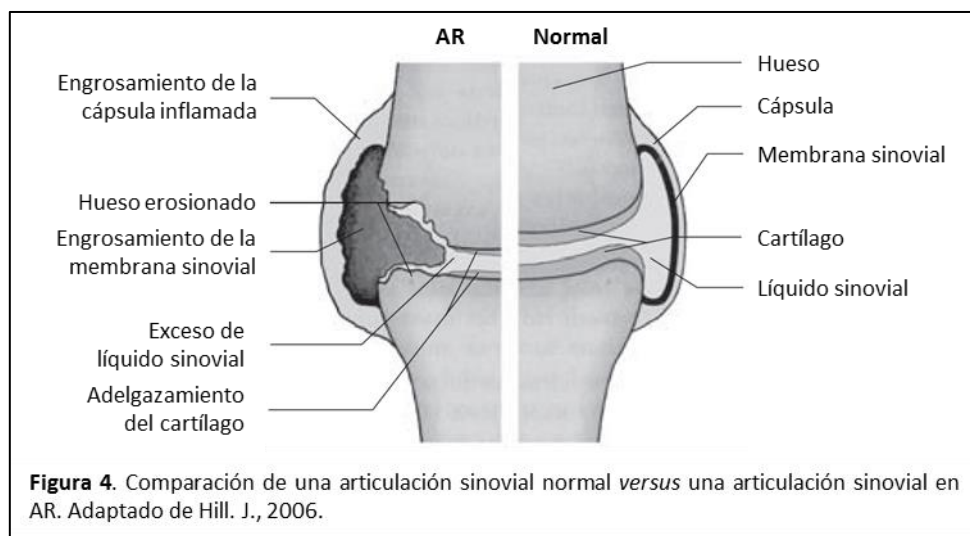
La AR tiene distribución mundial. Su prevalencia varía entre 0.2 % y 1 % y su incidencia entre 2 y 4 casos cada 10 000 habitantes por año. Es más frecuente en mujeres que en hombres, con una relación 2-3:1 en Estados Unidos. Puede aparecer a cualquier edad aunque lo hace, preferentemente, entre los 25 y los 50 años (Gutiérrez Dávila, J. M. *et al.*, 2003).

Estudios realizados en nuestro país establecieron una prevalencia de 0.2 % y una incidencia de 2.4 cada 10 000 habitantes por año (Spindler, A. *et al.*, 2002; Soriano, E. R. *et al.*, 2003).

Como toda enfermedad autoinmune se cree que aparece por anomalías en la respuesta inmune, innata o adaptativa, y que tiene componentes genéticos y ambientales.

2. 2. Patología y características clínicas

En la AR la membrana sinovial de las articulaciones se inflama y acumula linfocitos T y B, macrófagos y células plasmáticas. Este revestimiento se va engrosando gradualmente y forma el *pannus* que invade al cartílago articular. Finalmente, se produce la destrucción del cartílago y del hueso (Firestein, G. S., 1994) (Figura 4) que son visibles por radiografía de rayos X.



El aumento de la actividad de la enfermedad produce elevación de la eritrosedimentación (ESD) y de la proteína C reactiva (CRP) y factor reumatoideo (FR) positivo. También puede aumentar el número de plaquetas y presentarse anemia (Hill, J., 2006).

En general, la AR se caracteriza por dolor e inflamación de las articulaciones afectadas, rigidez matutina cuya duración varía entre minutos y horas, pérdida de la movilidad, fatiga, ansiedad y depresión. También pueden presentarse manifestaciones extrarticulares como nódulos subcutáneos, sequedad en ojos y boca (síndrome de Sjögren), pericarditis, pleuritis, etc. (Hill, J., 2006).

No sólo es la más frecuente de las enfermedades reumáticas inflamatorias, sino una de las de mayor tendencia a la destrucción articular. Aún en los estadios muy tempranos de la enfermedad (menos de tres meses de evolución) el 10 % de los pacientes ya presenta daño erosivo radiológicamente visible (Machold, K. P. *et al.*, 2007). Más aún, dentro de los 2 años de iniciados los síntomas las lesiones pueden hallarse hasta en el 70 % de los pacientes (van der Heijde, D. M., 1995; Wolfe, F. *et al.*, 1998).

2. 3. Clasificación, diagnóstico y evaluación de la actividad de la AR

Los criterios para la clasificación de la AR fueron desarrollados en 1987 por la Asociación Americana de Reumatismo o ARA (por sus siglas en inglés, *American Rheumatism Association*) (Arnett, F. C. *et al.*, 1988). La presencia de al menos cuatro de los siguientes siete criterios sugiere el diagnóstico de AR establecida. Además, del primer criterio al cuarto deben estar presentes por al menos seis semanas. Los criterios son:

1. Rigidez articular matutina de al menos una hora de duración antes de su mejoría máxima.
2. Inflamación articular o derrame sinovial, comprobados por un médico, de tres o más de las siguientes áreas articulares del lado derecho o izquierdo: interfalángicas proximales (IFP), metacarpofalángicas (MCF), muñeca, codo, rodilla, tobillo y metatarsofalángicas (MTF).
3. Inflamación o derrame en muñeca, MCF o IFP, comprobado por un médico.
4. Compromiso simultáneo de las mismas áreas articulares, referidas en el punto 2, en ambos lados del cuerpo, comprobado por un médico.
5. Nódulos subcutáneos en zonas de prominencia ósea, en superficies extensoras o en regiones yuxtarticulares, comprobado por un médico.
6. Presencia de FR sérico detectado por un método que sea positivo en menos del 5 % de la población control.
7. Evidencias radiográficas en las manos o en las muñecas de erosiones o descalcificación ósea en las articulaciones afectadas.

Desafortunadamente, estos criterios no fueron diseñados para el diagnóstico temprano de la enfermedad. Debido a que la destrucción de las articulaciones comienza dentro de las pocas semanas desde la aparición de los síntomas, es necesario realizar un diagnóstico y un tratamiento tempranos, de manera de disminuir al máximo la progresión de la enfermedad. También es indispensable el monitoreo de la AR en términos de pronóstico y respuesta terapéutica. Hasta el presente no existe un biomarcador que satisfaga tales necesidades y tampoco un único *test* que confirme el diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo, la realización de varias pruebas en conjunto puede incrementar las certezas del diagnóstico y permitir el seguimiento tanto de la progresión de la enfermedad como de la efectividad de los tratamientos.

Las pruebas de laboratorio que a menudo ayudan en el diagnóstico y en la evaluación de la actividad de la enfermedad en pacientes con AR son: la determinación de la ESD, determinación de los niveles de CRP, de FR y de anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados (anti-PCC).

Valores elevados de ESD se asocian con enfermedad severa. Desafortunadamente, este parámetro no es específico y puede verse afectado por otros factores como la edad, el sexo y la presencia de anemia (Maldonado Cocco, J. *et al.*, 2008).

En cuanto a CRP, este reactante de fase aguda ha demostrado buena correlación con la actividad de la enfermedad. Además, valores basales elevados predicen daño radiológico. Es más específico que la ESD, sin embargo, debe tenerse en cuenta que aproximadamente un 30 % de los pacientes con AR presentan reactantes de fase aguda dentro de valores normales a pesar de encontrarse en actividad (Maldonado Cocco, J. *et al.*, 2008).

El FR, un complejo de IgM e IgG, es el anticuerpo tradicional en AR. Altos niveles de FR se correlacionan con un peor pronóstico y una mayor actividad de la enfermedad (Hill, J., 2006). Tampoco es específico ya que en AR temprana es positivo sólo en el 35 % de los casos (Maldonado Cocco, J. *et al.*, 2008). Además, ser FR positivo no es diagnóstico de la enfermedad ya que puede encontrarse en otras enfermedades del tejido conectivo, en algunas infecciones crónicas y en enfermedades inflamatorias crónicas (Hill, J., 2006).

Los anticuerpos anti-PCC son producidos por células B y se han encontrado dentro de las articulaciones inflamadas en AR (Hill, J., 2006). La positividad de los anti-PCC es predictiva de artritis persistente y de daño radiológico. Estos autoanticuerpos, a pesar de tener sensibilidad similar al FR, han demostrado ser más específicos y con mayor valor predictivo positivo para AR (Maldonado Cocco, J. *et al.*, 2008).

También son de gran utilidad evaluaciones radiográficas de las articulaciones y evaluaciones mediante otras técnicas por imagen, como ecografía y resonancia magnética, que pueden detectar precozmente erosiones óseas (Maldonado Cocco, J. *et al.*, 2008).

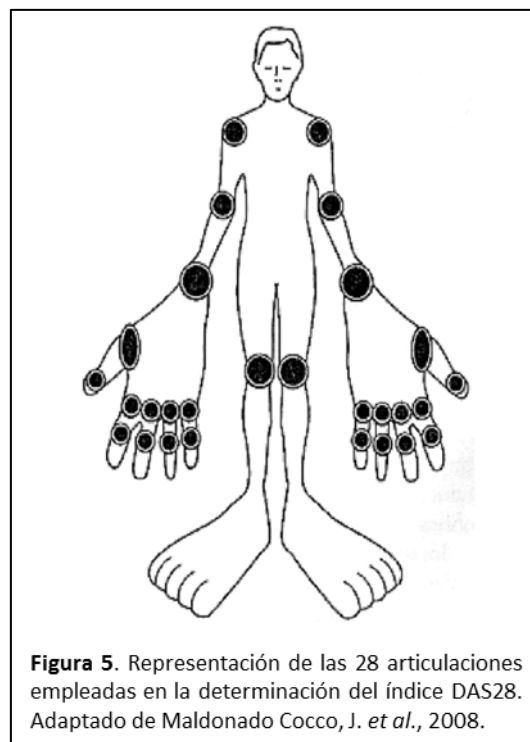
Para medir el dolor y la actividad de la enfermedad existen escalas analógicas visuales (VAS) que consisten en una línea horizontal de 100 mm de longitud. La escala que evalúa el dolor va desde 0 (ningún dolor) hasta 100 (máximo dolor). El paciente debe hacer una marca que represente el nivel de dolor que siente. Luego se mide la distancia entre la marca y el comienzo de la escala. La escala que se refiere a la actividad de la enfermedad puede ser determinada tanto por el paciente (evaluación global de la enfermedad desde el punto de vista del paciente, EGP) como por el médico (evaluación global de la enfermedad desde el punto de vista del médico, EGM). En este caso 0 corresponde a “muy bien” y 100 a “muy mal”. Estas escalas han demostrado ser una representación confiable del dolor experimentado por los pacientes y sensible al cambio en la actividad de la AR (Hill, J., 2006; Lázaro de Mercado, P. *et al.*, 2007; Maldonado Cocco, J. *et al.*, 2008).

Los cuestionarios de autoevaluación son indispensables para una adecuada evaluación del paciente con AR. El HAQ (por sus siglas en inglés, *Health Assessment Questionnaire*) es un

cuestionario de respuesta fácil y rápida y cálculo sencillo con buena reproducibilidad y consistencia interna (Ramey, D. R. *et al.*, 1992). Consta de 20 preguntas distribuidas en 8 categorías que incluyen: vestirse y arreglarse, levantarse, comer, caminar, higienizarse, alcanzar, prensión y otras actividades (Pincus, T. *et al.*, 2003). El valor de cada categoría se califica desde 0 (realizar las tareas sin dificultad) hasta 3 (incapacidad para hacerlo). Los valores de cada categoría son promediados y el resultado final tiene un rango de 0 (normal) a 3 (mayor grado de discapacidad). Un HAQ > 1.25 refleja enfermedad severa (Hawley, D. J. *et al.*, 1993). Un HAQ ≥ 0.87 se asocia con discapacidad laboral (Hogrefe, J. F. *et al.*, 2007).

La medición de la actividad de la enfermedad se ha convertido en un componente importante para el tratamiento de la AR. En este sentido, debido a que las evaluaciones clínicas y las pruebas de laboratorio no han demostrado un buen desempeño individual, estas se han incorporado en índices compuestos para alcanzar una mejor capacidad discriminativa. El que mejor califica para evaluar y discriminar entre alta y baja actividad de la AR es el DAS28 (Prevoo, M. L. *et al.*, 1995).

El DAS28 (por sus siglas en inglés, *Disease Activity Score using 28 joint counts*) comprende determinaciones subjetivas —número de articulaciones doloridas (NAD) y EGP— y objetivas —número de articulaciones inflamadas (NAI) y ESD—. En la Figura 5 se muestran las 28 articulaciones evaluadas en la determinación de este índice; el conteo articular no considera las articulaciones de pies, tobillos y caderas.



El DAS28 se calcula de la siguiente manera:

$$DAS28 = 0.56 \sqrt{NAD} + 0.28 \sqrt{NAI} + 0.70 (\ln ESD) + 0.014 (EGP)$$

Este índice puede tomar valores entre 0 y 9.4. Su interpretación es:

- $DAS28 \leq 3.2$: baja actividad.
- $DAS28 > 3.2$ y ≤ 5.1 : moderada actividad.
- $DAS28 > 5.1$: alta actividad.

Si bien este índice es mejor que el uso de una única determinación, hay que tener en cuenta que las determinaciones que lo componen, además de la subjetividad de dos de ellas, pueden verse influidas por el daño acumulativo y por otras enfermedades distintas a la AR (por ejemplo, fibromialgia y osteoartritis). Por lo tanto, para mejorar la evaluación clínica de la AR sería de gran valor el uso de información objetiva adicional acerca de procesos subyacentes a la enfermedad.

2. 4. Tratamientos y evaluación de la respuesta terapéutica

La AR requiere, generalmente, tratamiento de por vida que incluye medicamentos, fisioterapia, ejercicio, educación y, en ocasiones, cirugía.

Existen tres líneas de tratamientos con medicamentos (Hill, J., 2006):

- Terapias de primera línea. Se usan analgésicos como aspirina y paracetamol para aliviar el dolor, drogas antiinflamatorias no esteroideas o NSAID (por sus siglas en inglés, *non-steroidal anti-inflammatory drugs*) que reducen los síntomas producidos por la inflamación al disminuir la producción de prostaglandinas o corticoesteroides, que reducen la inflamación y la aparición de erosiones, cuyo modo de acción es mediante su unión a receptores específicos inhibiendo la producción de citoquinas clave y la activación y proliferación de células T.
- Terapias de segunda línea. Las drogas antirreumáticas modificadoras de la enfermedad o DMARD (por sus siglas en inglés, *disease-modifying antirheumatic drugs*) son inductoras de remisión de la enfermedad. Se usan combinadas entre ellas o con drogas de primera línea. Incluyen: metotrexato, azatioprina, compuestos de oro, hidroxicloroquina, entre otras.
- Terapias biológicas. Son terapias dirigidas que modifican la respuesta biológica. Se usan antagonistas de citoquinas proinflamatorias endógenas como receptores solubles o anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, Etanercept, Adalimumab e Infliximab bloquean a TNF- α , Rituximab (anti-CD20) está dirigido contra los linfocitos B, Anakinra bloquea la acción de IL-1 y Tocilizumab la de IL-6.

El objetivo del tratamiento de la AR es inducir la remisión completa de la enfermedad o, alternativamente, conseguir la mínima actividad inflamatoria posible. Los criterios de respuesta de EULAR (por sus siglas en inglés, *European League Against Rheumatism*) tienen en cuenta tanto el grado de mejoría como la situación actual del paciente. La respuesta de EULAR se define según el cambio logrado en el DAS28 luego del tratamiento (van Gestel, A. M. *et al.*, 1999):

DAS28 actual	Disminución en el DAS28		
	> 1.2	≥ 1.2 y > 0.6	≤ 0.6
≤ 3.2	Respuesta satisfactoria		
> 3.2 y ≤ 5.1		Respuesta insatisfactoria	
> 5.1			Sin respuesta

2. 5. Remisión de la AR

Existen dos criterios de remisión de la AR, uno establecido por ACR (por sus siglas en inglés, *American College of Rheumatology*) y otro por EULAR. El primero consiste en una evaluación global y el segundo evalúa la remisión según el DAS28.

Criterios de remisión de la AR según ACR (Pinals, R. S. *et al.*, 1981):

- Rigidez matutina ausente o no mayor a quince minutos.
- Ausencia de cansancio.
- Ausencia de dolor articular en la anamnesis.
- Ausencia de dolor articular a la presión.
- Ausencia de inflamación sinovial y tenosinovial.
- Eritrosedimentación normal.

La presencia de al menos cinco de estos criterios durante dos meses o más son suficientes para catalogar a un paciente en remisión completa de su enfermedad; siempre que no se encuentre alguna de las siguientes exclusiones: manifestaciones clínicas de vasculitis activa, pericarditis, pleuritis, miositis, pérdida de peso reciente sin causa o fiebre atribuida a la AR. Las desventajas de estos criterios son que no están adecuadamente detallados, no hay consenso sobre cómo evaluar fatiga y rigidez matutina y, además, tres de las seis variables son subjetivas (Maldonado Cocco, J. *et al.*, 2008).

Criterios de remisión de la AR según EULAR (Pinals, R. S. *et al.*, 1981; Fransen, J. *et al.*, 2004):

- DAS28 < 2.6.

Este valor está en revisión debido a que no todos los pacientes con DAS28 < 2.6 se encuentran en remisión. Un nuevo valor de corte de remisión propuesto para el DAS28 es < 2.4, pero aún este valor permite la presencia de hasta 12 articulaciones inflamadas. De todas maneras, es aconsejable tener en cuenta las articulaciones no evaluadas en el DAS28 antes de definir si un paciente se encuentra realmente en remisión (Mäkinen, H. *et al.*, 2005; Landewé, R. *et al.*, 2006).

3. TGF- β y AR

Existen evidencias de que TGF- β y sus receptores actúan como potentes reguladores de los eventos inflamatorios en el tejido sinovial de la AR. Tanto en líquido sinovial como en células derivadas de la estructura articular de pacientes con AR se han encontrado niveles aumentados de TGF- β 1 (Lafyatis, R. *et al.*, 1989; Chu, C. Q. *et al.*, 1991; Szekanecz, Z. *et al.*, 1995; Schlaak, J. F. *et al.*, 1996). Además, se han correlacionado los niveles séricos aumentados de TGF- β 1 en pacientes con AR con un mayor daño articular (Mieliauskaite, D. *et al.*, 2009).

La administración sistémica de TGF- β 1 en ratas susceptibles suprimió el desarrollo de artritis experimental. Se observó que TGF- β 1 revierte la leucocitosis asociada con la fase crónica de la artritis (Brandes, M. E. *et al.*, 1991b). Además, la inyección intraperitoneal de un anticuerpo neutralizante de TGF- β incrementó la artritis inducida en ratones DBA/1 (Thorbecke, G. *et al.*, 1992). Estos resultados sugieren que TGF- β , tanto exógeno como endógeno, tiene una actividad antiartrítica.

En contraposición con estos hallazgos, otros autores han mostrado que la inyección intrarticular de TGF- β induce eritema e inflamación de las articulaciones e infiltración leucocitaria de los tejidos sinoviales (Fava, R. A. *et al.*, 1991; Allen, J. B. *et al.*, 1990). Además, la inyección intrarticular de un anticuerpo neutralizante de TGF- β suprimió la artritis crónica y aguda en un modelo experimental de poliartritis (Wahl, S. M. *et al.*, 1993b). Según estos hallazgos TGF- β , tanto exógeno como endógeno, actuaría como pro-artrítico.

La posible explicación a estos resultados contradictorios puede encontrarse en la regulación diferencial de la inflamación por parte de TGF- β .

3. 1. Efectos de TGF- β sobre leucocitos en AR

Se ha demostrado que, en pacientes con AR, TGF- β ejerce un efecto singular sobre linfocitos, macrófagos y granulocitos.

En líquido sinovial, el uso de un anticuerpo específico contra TGF- β es capaz de neutralizar la mayor parte de la actividad que inhibe la proliferación de células T. Además, se demostró que en líquido sinovial TGF- β es capaz de inhibir completamente la proliferación de células T CD4⁺ y parcialmente la de los linfocitos T CD8⁺ (31.1 % de inhibición). Estos resultados indican que

este factor de crecimiento sería un modulador importante de la respuesta inmune en sinovitis (Lotz, M. *et al.*, 1990).

Otro estudio reveló que el líquido sinovial reumatoide suprime directamente la función de los linfocitos T y su señalización con células dendríticas. Esta inhibición es llevada a cabo, principalmente, por TGF- β y pareciera alterar indirectamente la regulación de las moléculas co-estimuladoras CD80/CD86 en células dendríticas. Esto sugiere que el TGF- β del líquido sinovial, al suprimir la señalización célula dendrítica-linfocito T, sería un componente principal involucrado en perpetuar la enfermedad clínica (Summers, K. L. *et al.*, 1999).

En lo que respecta a los macrófagos, estos parecen tener un rol central en la AR ya que están presentes en grandes cantidades tanto en la membrana sinovial inflamada como en la unión del cartílago con el *pannus* (Kinne, R. W. *et al.*, 2000). De hecho, se encontró que TGF- β 1 está presente en el 63 % de las células del revestimiento, 43 % de macrófagos intersticiales y en el 48 % de células vasculares endoteliales del tejido sinovial de AR, mientras que sólo se encuentra en unas pocas células del tejido sinovial normal y en osteoartritis (Szekanecz Z. *et al.*, 1995). Por lo tanto, TGF- β 1 actuaría como un potente regulador de los eventos inflamatorios, fibróticos y angiogénicos en el tejido sinovial de la AR.

Además, se ha demostrado que el tratamiento exitoso de pacientes con AR con DMARD produce un efecto substancial sobre el contenido de macrófagos de la membrana sinovial, con un efecto menos pronunciado sobre los linfocitos T de memoria. Esto sugiere que el efecto principal de las DMARD estaría dirigido contra los macrófagos, con la consecuente disminución de citoquinas pro y antiinflamatorias tales como IL-1 β , TNF- α y TGF- β (Smith, M. D. *et al.*, 2001).

En pacientes con enfermedades autoinmunes como la AR, y en modelos experimentales de estas enfermedades, se ha reportado función fagocítica deficiente de granulocitos, lo que podría contribuir al riesgo aumentado de infecciones observado en estos pacientes. TGF- β parece jugar un papel esencial en la adquisición de esta sensibilidad disminuida por parte de los granulocitos (Gresham, H. D. *et al.*, 1991).

Por otra parte, TGF- β es capaz de ejercer efectos patogénicos en el tejido sinovial, donde los granulocitos representarían una fuente significativa del TGF- β presente en los derrames sinoviales (Fava, R. A. *et al.*, 1991).

3. 2. Mecanismos de acción de TGF- β en AR

Aunque aún no está definitivamente establecido el mecanismo de acción de TGF- β en la AR, se postulan diversas acciones por medio de las cuales esta citoquina puede regular la patogénesis en el curso de la enfermedad:

- TGF- β puede modular la expresión de citoquinas inflamatorias tales como TNF- α e IL-1 β (Derynck, R. *et al.*, 1998).
- TGF- β regula la producción de metaloproteasas (Edwards, D. R. *et al.*, 1996).
- TGF- β 1 es un factor fuertemente quimiotáctico pudiendo atraer células inflamatorias al tejido sinovial (Allen, J. B. *et al.*, 1990).
- TGF- β puede acelerar la hipertrofia sinovial al inducir la proliferación de fibroblastos e, incluso, puede modular la apoptosis de los fibroblastos sinoviales (Derynck, R. *et al.*, 1998).
- TGF- β puede inducir la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF (por sus siglas en inglés, *vascular endothelial growth factor*), contribuyendo de esta manera, indirectamente, a la angiogénesis de la membrana sinovial artrítica (Berse, B. *et al.*, 1999).

4. Objetivos

4. 1. Objetivo general

Ampliar el conocimiento de la cascada de señalización de TGF- β en células humanas mediante el estudio de T β RII y sus variantes de *splicing*, que permita contribuir al conocimiento básico de dicha cascada así como al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y de diagnóstico de enfermedades en las cuales la señalización de TGF- β se encuentra desregulada.

4. 2. Objetivos específicos

- Caracterizar una nueva variante de *splicing* de T β RII en células humanas.
- Evaluar los niveles de ARNm de las distintas variantes de *splicing* de T β RII en células humanas tumorales y no tumorales, que permita detectar patrones diferenciales entre ellas o patrones específicos de tipo celular.
- Evaluar si los niveles de los ARNm de las variantes de *splicing* de T β RII en distintas poblaciones leucocitarias de pacientes con AR pueden ser utilizados como biomarcadores de diagnóstico y/o de determinación de la actividad y/o de pronóstico de la enfermedad.

Materiales y Métodos

1. Materiales

1. 1. Cepa bacteriana y plásmidos

Para la amplificación de plásmidos se empleó la cepa XL1-Blue de *Escherichia coli* (genotipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qΔM15 Tn10* (Tet^r)]). Los genes enumerados son alelos mutantes. Los genes del episoma F' son de tipo salvaje).

Como vector para el clonado de productos de PCR se empleó el plásmido pGEM[®]-T Easy Vector (Promega Corporation, WI, USA).

Para la generación de los vectores lentivirales se utilizaron los siguientes plásmidos:

pRSV-Rev (Dull, T. *et al.*, 1998): plásmido que expresa el ADNc de *rev*, gen regulador del HIV-1, en el cual el segundo y tercer exón de *rev*, unidos, se encuentran bajo el control transcripcional del promotor U3 de RSV. Además, lleva el gen de resistencia a ampicilina para su propagación y selección en bacterias.

pMDLg/pRRE (Dull, T. *et al.*, 1998): plásmido de expresión bajo el control del promotor del CMV que contiene las secuencias que codifican para *gag* y *pol*, genes estructurales comunes de retrovirus, y la secuencia que contiene RRE (motivo de ARN, elemento de respuesta a Rev) del HIV-1. Lleva, además, el gen de resistencia a ampicilina para su propagación y selección en bacterias.

pCMV-VSV-G (Stewart, S. A. *et al.*, 2003): plásmido que codifica para la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular, VSV-G (por sus siglas en inglés, *G glycoprotein of the vesicular stomatitis virus*), bajo el control del promotor del CMV. VSV-G media la entrada viral a la célula. Como no necesita un receptor celular de superficie, VSV-G puede usarse como una proteína de envoltura viral sustituta. El plásmido lleva, además, el gen de resistencia a ampicilina, para su propagación y selección en bacterias.

pRRL-SIN 18-CMV-pPGK GFP-WPRE (Zufferey, R. *et al.*, 1998): plásmido de transferencia lentiviral, gentilmente cedido por el Prof. Luigi Naldini, Milán, Italia.

1. 2. Líneas celulares y cultivos primarios

Nombre	ATCC N°	Descripción	Medio de cultivo
A549	CCL-185	Línea celular derivada de carcinoma de pulmón humano.	DMEM suplementado.
HT-1080	CCL-121	Línea celular derivada de fibrosarcoma humano.	DMEM suplementado.
Caco-2	HTB-37	Línea celular derivada de adenocarcinoma colorrectal humano.	DMEM suplementado + aminoácidos no esenciales + HEPES 25 mM.
Hep 3B	HB-8064	Línea celular derivada de carcinoma hepatocelular humano.	DMEM suplementado.
Jurkat, Clon E6-1	TIB-152	Línea celular derivada de leucemia linfoide aguda de linfocitos T humanos.	RPMI suplementado.
HEK-293	CRL-1573	Línea celular derivada de células humanas embrionarias de riñón inmortalizadas con la proteína E1A de adenovirus.	DMEM suplementado.
293T	CRL-11268	Línea celular derivada de células humanas embrionarias de riñón inmortalizadas con el antígeno T de SV40.	DMEM suplementado.
hASC	-	Cultivo primario de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano.	DMEM suplementado.
B95.8	CRL-1612	Línea celular derivada de linfocitos de mico.	RPMI suplementado.
EBV-LCL	-	Línea celular linfoblastoide humana inmortalizada con el virus de Epstein-Barr	RPMI suplementado.
hPBMC	-	Cultivo primario de células mononucleares de sangre periférica humana.	RPMI suplementado.

Las líneas celulares y cultivos primarios utilizados fueron crecidos a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂. En todos los casos se trabajó con células libres de micoplasma, determinado mediante tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) y posterior microscopía de fluorescencia.

1. 3. Muestras de pacientes con artritis reumatoidea y de voluntarios sanos

El estudio se realizó en colaboración con el Director del Instituto Médico CER, Dr. Jorge Velasco Zamora. Las muestras fueron obtenidas en dicho Instituto, donde también fueron realizados los estudios clínicos y bioquímicos. Todos los voluntarios incluidos en este estudio firmaron consentimiento informado previo a la toma de datos y muestras. El estudio fue aprobado por el comité institucional de bioética del Servicio de Reumatología del Instituto Médico CER, Quilmes, Bs. As y por el Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires.

1. 4. Enzimas

Todas las enzimas empleadas en los procedimientos de biología molecular fueron adquiridas de Promega (Promega, WI, USA), New England Biolabs (NEB, Bad Schwalbach, Alemania) o de Roche (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania).

1. 5. Anticuerpos y citoquinas

Todos los anticuerpos se conservaron a 4 °C hasta su uso.

Las citoquinas fueron reconstituidas en agua calidad Milli-Q, separadas en alícuotas y conservadas a -20 °C hasta su uso. Una vez descongeladas se conservaron a 4 °C por cortos períodos de tiempo.

Anticuerpo/citoquina	Uso	Dilución	Compañía
TGFβ RII (C4), anticuerpo monoclonal anti TGFβ RII humano	Inmunoensayos	1/100 ó 1/50	Santa Cruz Biotechnology
Anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a HRP	Inmunoensayos	1/2500	GE Healthcare Life Sciences
Anticuerpo monoclonal anti CD3 humano conjugado a partículas magnéticas	Selección positiva de subpoblaciones sanguíneas	20 µl cada 10 ⁷ células totales	Miltenyi Biotec
Anticuerpo monoclonal anti CD14 humano conjugado a partículas magnéticas	Selección positiva de subpoblaciones sanguíneas	20 µl cada 10 ⁷ células totales	Miltenyi Biotec
Anticuerpo monoclonal anti CD19 humano conjugado a partículas magnéticas	Selección positiva de subpoblaciones sanguíneas	20 µl cada 10 ⁷ células totales	Miltenyi Biotec
Anticuerpo monoclonal anti CD3, CD 4 y CD8 humanos conjugados a PCP, FITC y PE, respectivamente	Marcación de subpoblaciones sanguíneas con fluorocromos	16 µl cada 10 ⁶ células	BD (Becton, Dickinson and Company)

Anticuerpo monoclonal anti CD14 humano conjugado a PE	Marcación de subpoblaciones sanguíneas con fluorocromos	16 µl cada 10 ⁶ células	BD (Becton, Dickinson and Company)
Anticuerpo monoclonal anti CD19 humano conjugado PE	Marcación de subpoblaciones sanguíneas con fluorocromos	16 µl cada 10 ⁶ células	BD (Becton, Dickinson and Company)
TGF-β1	Ensayo MTT	Hasta 0.4 nM	PeproTech Mexico
TGF-β2	Ensayo MTT	Hasta 0.4 nM	PeproTech Mexico

2. Métodos

2. 1. Procedimientos microbiológicos

2. 1. 1. Preparación de bacterias competentes químicas

Las bacterias competentes químicas se prepararon como se describe en Maniatis, T. *et al.* (1982), con algunas modificaciones. Brevemente, se partió de una colonia de bacterias XL1-Blue en placa de LB sólido. La colonia se inoculó en 5 ml de medio LB y se cultivó durante 16 horas a 37 °C con agitación. Un mililitro de este cultivo se utilizó para inocular 50 ml de medio LB. Este nuevo cultivo se creció a 37 °C y 225 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de entre 0.45 y 0.55. Posteriormente, se enfriaron las bacterias 15-30 minutos en hielo y, luego, se centrifugaron 8 minutos a 3000 rpm y 4 °C. Una vez eliminado el sobrenadante, se resuspendió delicadamente el *pellet* que contenía las bacterias en 5 ml de medio LB y 5 ml de TSS-2X y se incubaron otros 15-30 minutos en hielo. Las bacterias competentes químicas obtenidas se fraccionaron en alícuotas de 200 µl, se congelaron en N₂ líquido y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

2. 1. 2. Transformación de bacterias competentes químicas

La transformación de bacterias competentes químicas se realizó como se describe en Maniatis, T. *et al.* (1982), con algunas modificaciones. Brevemente, se descongelaron 50 µl de bacterias competentes químicas durante 10 minutos en baño de agua-hielo. Luego, se les agregaron 5-20 ng de la mezcla de ligación o plásmido a amplificar y se continuó con la incubación en hielo durante 30 minutos. A continuación se les realizó el *shock* térmico incubándolas 90 segundos a 42 °C y, luego, transfiriéndolas rápidamente a hielo durante 2 minutos. Posteriormente se les agregaron 200 µl de LB sin antibiótico y se las cultivó durante 30 minutos a 37 °C con agitación. Una vez recuperado el cultivo bacteriano se lo sembró en placas

con medio LB sólido en presencia de ampicilina ($100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) y se incubaron a 37°C durante 16 horas.

2. 2. Técnicas de biología molecular

2. 2. 1. Extracción de ARN

El ARN fue aislado a partir de 10^4 - 10^6 células usando el kit comercial Absolutely RNA[®] Miniprep Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) o el kit comercial SV Total RNA Isolation System (Promega, WI, USA), siguiendo en cada caso las instrucciones de los fabricantes. El ARN purificado se resuspendió en $50 \mu\text{l}$ de *buffer* de elución o de agua libre de nucleasas, según la recomendación del fabricante de cada kit, se cuantificó usando un espectrofotómetro BioPhotometer (Eppendorf, Alemania) y se conservó a -80°C hasta su uso.

2. 2. 2. Generación de ADN complementario (ADNc)

Las reacciones de retrotranscripción se realizaron en un volumen final de $25 \mu\text{l}$ compuesto de $1.5 \mu\text{g}$ de ARN, $0.02 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ de *primers* OligodT15 (Biodynamics) y 200 U de transcriptasa reversa de M-MLV (Promega, WI, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ADNc generado se conservó a -80°C hasta su uso.

2. 2. 3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

2. 2. 3. 1. RT-PCR

Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo en un termociclador MyCycler[™] Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). Las reacciones se realizaron en un volumen final de $10 \mu\text{l}$ compuesto de $0.5 \mu\text{M}$ *primers* directo y reverso, 0.2 mM dNTPs, $2 \mu\text{l}$ de molde (ADNc sin diluir o en diluciones 1/5 y 1/10) y 0.25 U de GoTaq (Promega, WI, USA). Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C ; 35 ciclos de 1 minuto a 95°C , 1 minuto a 62°C y 1 minuto a 72°C y 1 ciclo de 10 minutos a 72°C . Las secuencias de los *primers* utilizados son: T β R11-F: 5' ACCGGTATGGGTCGGGGCTGCTC 3', T β R11-R: 5' GTCGACTCAGTAGCAGTAGAAGATG 3'. Estos *primers* permiten amplificar y diferenciar las tres variantes del receptor, puesto que se obtienen fragmentos de distinto tamaño para cada una de ellas (Figura 6). Como control de carga se utilizaron *primers* que amplifican el gen constitutivo de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), cuyas secuencias son: GAPDH-F: 5' GTCAGTGGTGGACCTGACC 3', GAPDH-R: 5' TGAGCTTGACAAAGTGGTCG 3'.

2. 2. 3. 2. RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)

Las reacciones de RT-qPCR se realizaron usando un equipo Mx3005P[™] (Stratagene, USA). Las reacciones se realizaron en un volumen final de $10 \mu\text{l}$ compuesto de $2 \mu\text{l}$ de ADNc, Fast Start Universal SYBR Green Master (ROX) 1X (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), 300 nM

de *primers* directo y reverso para la amplificación de T β RII, T β RIIB y GAPDH y 200 nM para la amplificación de seT β RII. En cada ensayo las muestras se analizaron por triplicado. Para la normalización se amplificó el gen constitutivo GAPDH con los *primers* descritos anteriormente. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 15 minutos a 95 °C y 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C y 30 segundos a 62 °C. Luego, se realizó una curva de disociación para evaluar la presencia de productos de amplificación inespecíficos. Las secuencias de los *primers* usados fueron: P1: 5' CTGTAATAGGACTGCCCATC 3', P2: 5' TCTCTAGTGTTATGTTCTCGTC 3', P3: 5' GCACGTTTCAGAAGTCGGTTAA 3', P4: 5' GCACTTTGGAGAAGCAGGATT 3'. Para la amplificación específica de las distintas variantes de *splicing* de T β RII se utilizaron distintas combinaciones de estos *primers*. Para T β RII se usaron los *primers* P2 y P3, para T β RIIB P1 y P2 y para seT β RII los *primers* P3 y P4 (Figura 14).

2. 2. 4. Electroforesis en geles de agarosa

La separación y detección de fragmentos de ADN se realizó en geles de agarosa (0.8-1.5 %) en presencia de bromuro de etidio (2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). La electroforesis se realizó en *buffer* TBE 1X, a 80-100 V durante 20-40 minutos. La presencia de ADN se evidenció usando un transiluminador UV Hoefer MacroVue UV-20 (Amersham Biosciences, USA) ($\lambda=260$ nm). Los tamaños de los fragmentos de ADN se estimaron comparándolos con marcadores de peso molecular: peqGOLD 100 pb DNA-Ladder (peqlab, Biotechnologie GmbH, Alemania), 1 Kb DNA Ladder y 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA). Cuando fue necesario, se realizó la extracción del ADN de los geles empleando el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante.

2. 2. 5. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones de ADN se llevaron a cabo con las enzimas de restricción elegidas en las condiciones óptimas para cada una de ellas, siguiendo las indicaciones del fabricante (Promega, New England Biolabs).

2. 2. 6. Generación de plásmidos recombinantes

El clonado de fragmentos de ADN amplificados por PCR se realizó en el plásmido pGEM[®]-T Easy Vector (Promega, WI, USA) usando 3 U de la enzima ADN ligasa de T4 (Promega, WI, USA), en una relación molar inserto:vector de 3:1, siguiendo las indicaciones de fabricante.

2. 2. 7. Secuenciación de fragmentos de ADN

Las secuencias nucleotídicas de los insertos clonados en el plásmido pGEM[®]-T Easy Vector (Promega, WI, USA) se confirmaron por secuenciación utilizando el secuenciador ABI 3130 de 4 capilares (Applied Biosystems Inc, CA, USA) del servicio de secuenciación del Instituto de

Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH), Sede San Martín.

2. 2. 8. Minipreparación de ADN plasmídico (miniprep)

Para comprobar la presencia de los clones buscados, inicialmente se purificaron los plásmidos recombinantes mediante la técnica de lisis alcalina (Maniatis, T. *et al.*, 1982). En los casos de plásmidos que iban a ser secuenciados, se empleó el método de minipreparación por precipitación con PEG, descrito en Maniatis, T. *et al.* (1982), con leves modificaciones.

2. 2. 9. Preparación de ADN plasmídico en gran escala (maxipreparación)

Para la transfección de células de humanas se utilizaron plásmidos de alta pureza que se obtuvieron con el kit comercial QIAGEN Plasmid Maxi Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante.

2. 2. 10. Obtención de suero humano

Para la obtención de suero humano (SH), muestras de sangre periférica sin anticoagulante se dejaron reposar en tubos cónicos de 50 ml durante 3 horas a 25 °C, hasta observar la formación del coágulo. Se centrifugaron 20 minutos a 500 g y se separó con pipeta el suero sobrenadante en un nuevo tubo. A continuación, se volvió a centrifugar 20 minutos a 1800 g, se trasvasó el suero a un otro tubo y se repitió esta última centrifugación una vez más. El SH obtenido se conservó en alícuotas a -20 °C ó -80 °C hasta su uso.

2. 2. 11. Obtención, cuantificación y concentración de proteínas

Para disminuir la degradación de proteínas los sobrenadantes celulares provenían de cultivos realizados en presencia de inhibidores de proteasas (PIC para usar en medio de cultivo celular, Sigma-Aldrich, MO, USA). Con el mismo objetivo, al SH se le agregó inhibidores de proteasas. En ambos casos el PIC se usó al 0.25 %. Las muestras proteicas se conservaron a -80 °C hasta su uso.

La cuantificación de proteínas presentes en el medio de cultivo o en el SH se realizó mediante el método de Bradford, realizando una curva estándar con BSA. Tanto los estándares para la construcción de la curva como las muestras a cuantificar se midieron a 595 nm usando un espectrofotómetro BioPhotometer (Eppendorf, Alemania). Cuando la concentración de proteína determinada fue muy baja, las muestras se concentraron por precipitación con acetona. Para ello, se agregó 1 volumen de acetona fría a la muestra proteica, se mezcló por inversión y se incubó 16 horas a -20 °C. Luego, se centrifugó 10 minutos a 4 °C y 10000 g, se eliminó el sobrenadante, se dejaron secar los *pellets* y se resuspendieron en *buffer* hipotónico.

2. 2. 12. Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación se realizó a partir de 500 µl de SH. Este se mezcló con *buffer* RIPA e inhibidores de proteasas para sobrenadantes celulares al 0.25 % (PIC para usar en medio de cultivo celular, Sigma-Aldrich, MO, USA) en un volumen final de 1 ml. La mezcla se incubó 30 minutos a 4 °C con rotación y, luego, se limpió de sus Ig preincubándola otros 30 minutos a 4 °C con rotación, con 40 µl de proteína A/G Plus (Santa Cruz Biotechnology) previamente lavada. El lavado de la proteína A/G Plus consistió en mezclar 40 µl de proteína A/G Plus con 40 µl de *buffer* RIPA y, luego, centrifugar 5 minutos a 4°C y 1000 g, quedándose con el *pellet* que se resuspendió en otros 40 µl de *buffer* RIPA. Este lavado se repitió 2 veces en total. La mezcla de SH y proteína A/G Plus se centrifugó 5 minutos a 4 °C y 1000 g y se pasó el sobrenadante a un tubo limpio. Se le agregaron 40 µl del anticuerpo TGFβ RII (C-4) (Santa Cruz Biotechnology) y se incubó 16 horas a 4 °C con rotación. Pasado ese tiempo, se agregó a la mezcla de SH y anticuerpo 40 µl de proteína A/G Plus lavada, como se mencionó anteriormente, y se volvió a incubar 16 horas a 4 °C con rotación. A continuación, se centrifugó 5 minutos a 4 °C y 1000 g, se conservó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* con los inmunocomplejos en 1 ml de *buffer* RIPA. Este lavado se repitió 3 veces más y, luego de la última centrifugación, el *pellet* se resuspendió en 20 µl de *buffer* de siembra para proteínas 1X y 5 µl de *buffer* de siembra para proteínas 5X. Esta muestra se calentó 5 minutos a 95 °C, se realizó un *spin* y se conservó el sobrenadante con los inmunocomplejos para su posterior corrida en un SDS-PAGE.

2. 2. 13. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Los sobrenadantes celulares (160 µg de proteínas totales) y el SH inmunoprecipitado se separaron en geles de poliacrilamida al 15 % con SDS (SDS-PAGE). En primer lugar, se agregó a las muestras *buffer* de siembra para proteínas 5X y se calentaron 5 minutos a 95 °C. Luego, las muestras se sembraron en el gel junto con el marcador de pesos moleculares de proteínas preteñido PageRuler™ (Thermo Scientific), para poder estimar los pesos de las proteínas separadas. Las electroforesis se llevaron a cabo en *buffer* SDS-PAGE 1X a 60 mA, hasta que el frente de corrida llegó al final del gel.

2. 2. 14. Western-Blot

La presencia de seTβRII en sobrenadantes celulares se evaluó mediante análisis por *western-blot*. Para ello, las proteínas separadas en SDS-PAGE fueron transferidas durante 1 hora, a 350 mA y en hielo, a membranas de PVDF (Thermo Scientific, IL, USA) en presencia de *buffer* de transferencia. Luego de incubar 1 hora con agitación en solución de bloqueo y de tres lavados de 10 minutos cada uno, las membranas se incubaron con una dilución 1/100 del anticuerpo primario TGFβ RII (C-4) (Santa Cruz Biotechnology) durante 16 horas a 4 °C. Como anticuerpo secundario se empleó el anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a HRP. La incubación con el mismo fue durante 1 hora a 25 °C con agitación, realizando tres lavados de

10 minutos cada uno, antes y después de la misma. La detección de proteínas se realizó con el kit comercial Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Life Sciences, UK), siguiendo las indicaciones de los fabricantes.

2. 2. 15. Adquisición de imágenes de geles de agarosa y acrilamida y revelado y adquisición de imágenes de membranas de *western-blot*

Las imágenes de geles de agarosa y de acrilamida se obtuvieron con el equipo FOTO/Analyst Investigator (Fotodyne Incorporated, USA) y su *software* PC Image, empleando el filtro correspondiente, bajo iluminación UV.

Los *western-blot*s, se revelaron en cuarto oscuro por exposición de placas radiográficas CL-X Posure™ Film (Thermo Scientific, IL, USA) a las membranas. Luego, las placas fueron sumergidas en solución de revelado y, a continuación, en solución fijadora.

2. 3. Procedimientos con cultivos celulares eucariotas

2. 3. 1. Aislamiento de leucocitos de sangre periférica humana

2. 3. 1. 1. Separación de células sanguíneas

A partir de sangre periférica heparinizada (15-20 UI heparina sódica, 0.1-0.2 mg·ml sangre⁻¹) se realizó una centrifugación por gradiente con Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB) luego de la que se obtuvieron dos fracciones celulares. Una contenía granulocitos y eritrocitos y, la otra, células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Para obtener los granulocitos puros, los eritrocitos se lisaron con 0.6 M KCl. Granulocitos y PBMC fueron cuantificados en cámara de Neubauer por medio del método de exclusión con azul de tripano. Los granulocitos se conservaron a -80 °C, en *buffer* de lisis para extracción de ARN, hasta su uso.

2. 3. 1. 2. Inmunoseparación magnética de subpoblaciones de células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleares, obtenidas luego del gradiente con Ficoll, fueron purificadas mediante la utilización de anticuerpos monoclonales anti CD3⁺, CD14⁺ y CD19⁺ conjugados a partículas magnéticas (MicroBeads, Miltenyi Biotec). La separación magnética se realizó utilizando columnas MS (Miltenyi Biotec) en un Separador MiniMACS (Miltenyi Biotec), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células viables purificadas fueron cuantificadas en cámara de Neubauer por medio del método de exclusión con azul de tripano. La pureza de cada población fue determinada mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos conjugados a fluorocromos (BD, USA) y detección por citometría de flujo con un equipo

FACSCalibur™ (BD, USA). Las células purificadas se conservaron a -80 °C, en *buffer* de lisis para extracción de ARN, hasta su uso.

2. 3. 1. 3. Separación de linfocitos totales y de monocitos a partir de células mononucleares de sangre periférica mediante adhesión diferencial al plástico

Los linfocitos totales y monocitos de pacientes con AR y de voluntarios sanos se separaron a partir de las PBMC según sus propiedades de adherencia al plástico diferenciales. Para ello, las PBMC se cultivaron 2 horas en medio RPMI suplementado con 10 % de SH, luego de lo cual se colectó el sobrenadante celular que contenía mayoritariamente linfocitos. Los monocitos, adheridos a la botella de cultivo, se crecieron durante 16 horas luego de lo cual se cosecharon mediante tratamiento con tripsina-EDTA. La pureza de ambas poblaciones fue determinada por citometría de flujo, con un equipo BD FACSCalibur™ (BD, USA), haciendo uso del tamaño celular (FSC) y de la granularidad celular (SSC). Las células viables de ambas poblaciones fueron cuantificadas por el método de exclusión con azul de tripano en una cámara de Neubauer. Se conservaron a -80 °C, en *buffer* de lisis para extracción de ARN, hasta su uso.

2. 3. 2. Generación de líneas celulares linfoblastoides humanas inmortalizadas con el virus de Epstein-Barr (EBV-LCL)

La infección de PBMC se realizó mediante el agregado de 2.5 ml de sobrenadante de células B95.8, que contiene las partículas del virus de Epstein-Barr, a 10^7 PBMC resuspendidas en 2.5 ml de medio RPMI suplementado. La mezcla se incubó 2 horas a 37 °C, luego de lo cual se agregaron 5 ml de medio RPMI suplementado con $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de ciclosporina A (Neoral, Novartis). Las células así infectadas se transfirieron a una botella de cultivo de 25 cm² y se incubaron durante 3 semanas a 37 °C.

2. 3. 3. Producción de vectores lentivirales

Los vectores lentivirales se generaron mediante transfección de células 293T con 8 μg del plásmido de transferencia junto a 12 μg del plásmido pMDLg/pRRE, 2 μg de pCMV-VSVG y 5 μg de pRSV-REV, utilizando el método de precipitación con fosfato de calcio como se describe en Schambach, A. *et al.* (2006). Brevemente, se cultivaron 5×10^6 células 293T por placa de cultivo de 10 cm de diámetro en presencia de DMEM suplementado. Luego de la incubación durante 6 horas a 37 °C, el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco y 25 μM de cloroquina, para disminuir la degradación lisosomal de los plásmidos transfectados. Por otra parte, se preparó una mezcla compuesta por los 4 plásmidos antes mencionados y 50 μl de CaCl_2 2 M, en un volumen final de 500 μl . Esta mezcla fue agregada a un tubo que contenía 500 μl de HBS 2X y, rápidamente, se agitó durante 15 segundos utilizando un vórtex. La mezcla de ADN con fosfato de calcio se agregó, gota a gota, sobre la monocapa de células 293T. Las células se incubaron durante 16 horas a 37 °C, luego de lo cual se lavaron y se reemplazó el medio de

cultivo por medio fresco. El sobrenadante celular, que contenía las partículas del vector lentiviral, se cosechó tres veces reemplazándolo por medio de cultivo fresco cada vez, con una periodicidad de ocho horas. Los sobrenadantes con las partículas del vector lentiviral se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm y se purificaron mediante la utilización de un filtro con diámetro de poro de 0.22 µm. Los sobrenadantes con las partículas lentivirales se fraccionaron en alícuotas y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

2. 3. 4. Titulación de los sobrenadantes virales

Para la determinación de los títulos virales se sembraron 10^5 células A549 por pocillo en una placa de 6 pocillos. Luego de incubar las células durante 6 horas a 37 °C, se agregaron distintas diluciones del sobrenadante con las partículas virales y $8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de polibreno. Tres días después, las células se cosecharon y el porcentaje de células que expresaban EGFP se evaluó mediante citometría de flujo con un equipo BD FACSCalibur™ (BD, USA). Con los valores obtenidos se calcularon los títulos virales correspondientes, expresados en unidades de transducción (UT)·ml⁻¹. Para ello, se multiplicó el número de células sembradas por pocillo por el factor de dilución y por el porcentaje de células que expresaban EGFP y, luego, se dividió por el volumen en el que se sembraron las células:

$$\text{Título viral (UT} \cdot \text{ml}^{-1}) = \frac{n^{\circ} \text{ células} \times \text{factor de dilución} \times \% \text{ células EGFP}^{+}}{\text{volumen}}$$

Los títulos de los vectores lentivirales obtenidos fueron del orden de 10^6 - 10^8 UT·ml⁻¹.

2. 3. 5. Transducción de la línea celular A549 con vectores lentivirales

Células A549 fueron transducidas con los vectores lentivirales a una multiplicidad de infección (MOI) de 50 unidades de transducción (UT) por célula, en presencia de $8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de polibreno, durante 3 días. La eficiencia de la transducción se determinó mediante citometría de flujo, midiendo el porcentaje de células que expresaban EGFP, con un equipo BD FACSCalibur™ (BD, USA).

2. 3. 6. Determinación de viabilidad y proliferación celular: ensayo MTT

La sensibilidad o insensibilidad de células A549 a TGF-β se determinó usando el ensayo MTT, como se describe en Kim, M. S. *et al.* (2002). Este método se basa en la capacidad de las células vivas de reducir, mediante la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial, la sal de tetrazolio MTT (amarilla) a cristales de formazán (azul-violeta).

Brevemente, 5×10^4 células A549, transducidas y sin transducir, se sembraron por pocillos en una placa de 96 pocillos con DMEM suplementado. Luego de 5 horas en cultivo, se cambió el medio de los pocillos por DMEM suplementado sin SFB y se incubó 16 horas más. Pasado ese tiempo se cambió nuevamente el medio por medio para ensayo MTT y se agregó TGF-β1 o

TGF- β 2 (PeproTech, Mexico) a los pocillos correspondientes. Se incubó durante 3 días y, a continuación, se agregaron 5 μ l de solución 5 mg·ml⁻¹ de MTT (Sigma Chemical CO, MO, USA) a cada pocillo. Se incubó 4 horas más en oscuridad y, luego, la reacción se detuvo reemplazando el medio de cultivo de los pocillos por 100 μ l de DMSO. La medida de la DO se realizó a 540 nm usando un equipo Synergy H1 Hybrid Reader (BioTek Instruments, Inc.). Como blanco de referencia para realizar los cálculos se usaron pocillos sin células que se trataron de igual manera que los demás pocillos. La proliferación celular se calculó como el porcentaje de la relación entre las células sin y con TGF- β . Los ensayos se realizaron por triplicado. En todos los casos, los resultados se expresaron como el promedio \pm la desviación estándar (SD).

2. 3. 7. Citometría de flujo

Para el análisis por citometría de flujo se emplearon, como mínimo, 5 \times 10⁴ células viables cuantificadas en una cámara de Neubauer por el método de exclusión con azul de tripano. Las células se resuspendieron en 100 μ l de solución de fijado. Las medidas se hicieron con un equipo FACSCalibur (BD Biosciences, USA) y el análisis de los datos obtenidos con el programa WinMDI.

2. 4. Estadística

El análisis estadístico de los datos provenientes de las RT-qPCR se hizo empleando el *software* InfoStat (Di Rienzo, J. A. *et al.*, 2010).

Los contrastes de medias se realizaron mediante el *test* de Student, cuando se contrastaron dos muestras; y mediante ANOVA de una vía seguido por el *test* de Tukey, cuando el contraste fue entre tres o más muestras. El análisis de las correlaciones se hizo a través del *test* de Spearman. Para realizar estos *tests* se utilizó el *software* OriginPro 8.5.1 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA).

En todos los casos, valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

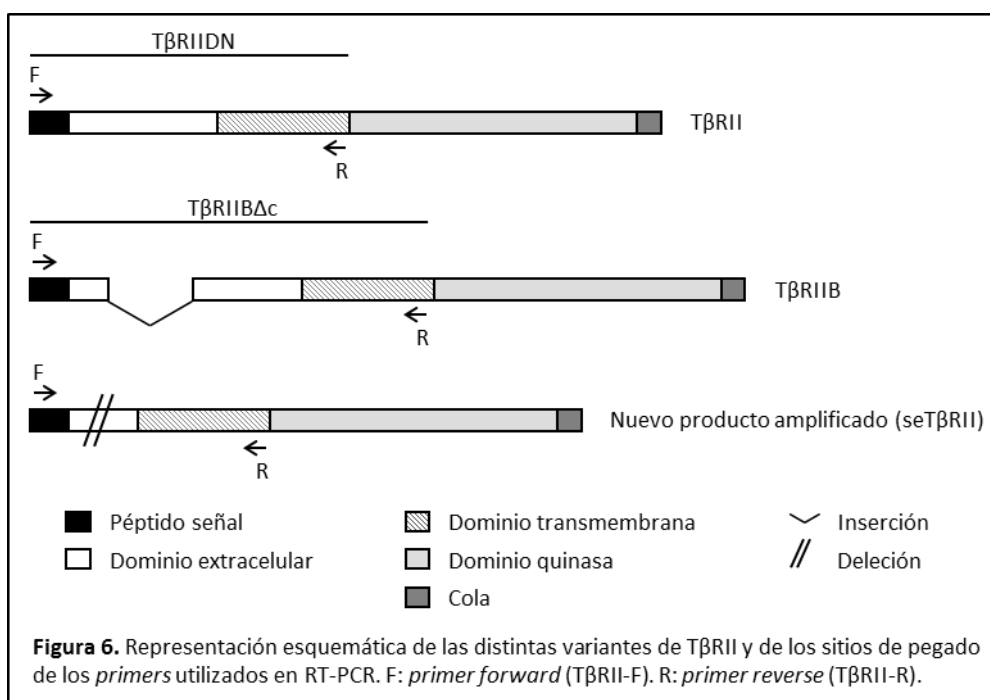
-Capítulo 1-

Caracterización de una nueva variante de *splicing* de TβRII humano

1. Determinación, y análisis *in silico*, de la secuencia de la nueva variante de *splicing* de T β RII

En este capítulo se describe, por primera vez, una nueva variante de *splicing* del receptor tipo II de TGF- β en células humanas.

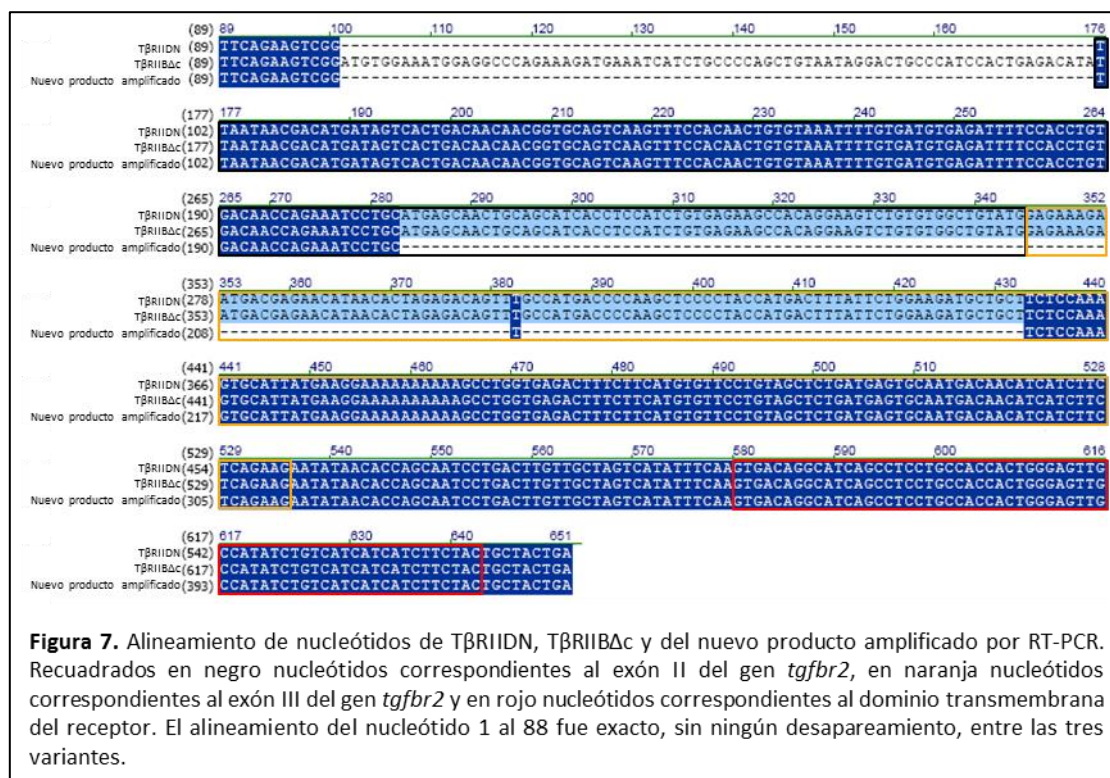
Inicialmente, en búsqueda de generar un mutante dominante negativo del receptor T β RII carente del dominio intracitoplasmático, se amplificó ARNm de linfocitos humanos mediante RT-PCR utilizando *primers* que permiten amplificar sólo la región extracelular y el dominio transmembrana de los receptores tipo II de TGF- β conocidos (T β RII y T β RIIB) (Figura 6). Así, a T β RII carente del dominio intracelular se lo denominó T β RIIDN y a T β RIIB sin la porción citoplasmática se lo llamó T β RIIB Δ c (Δ c por la delección de la secuencia citoplasmática). Cuando los productos de amplificación se analizaron en gel de agarosa se pudo observar, además de los correspondientes a las amplificaciones de T β RIIDN y T β RIIB Δ c de 582 pb y 657 pb, respectivamente, una tercera banda más pequeña de 433 pb.



Para confirmar si se trataba de una nueva variante de *splicing* de T β RII, la banda de 433 pb se purificó del gel de agarosa y se clonó en el vector pGEM-T Easy (Promega, WI, USA). El ADN plasmídico obtenido de los clones recombinantes se secuenció utilizando *primers* de M13 (directo y reverso), complementarios al vector pGEM-T Easy, y las secuencias obtenidas se alinearon con las secuencias correspondientes a las de las otras dos variantes de T β RII.

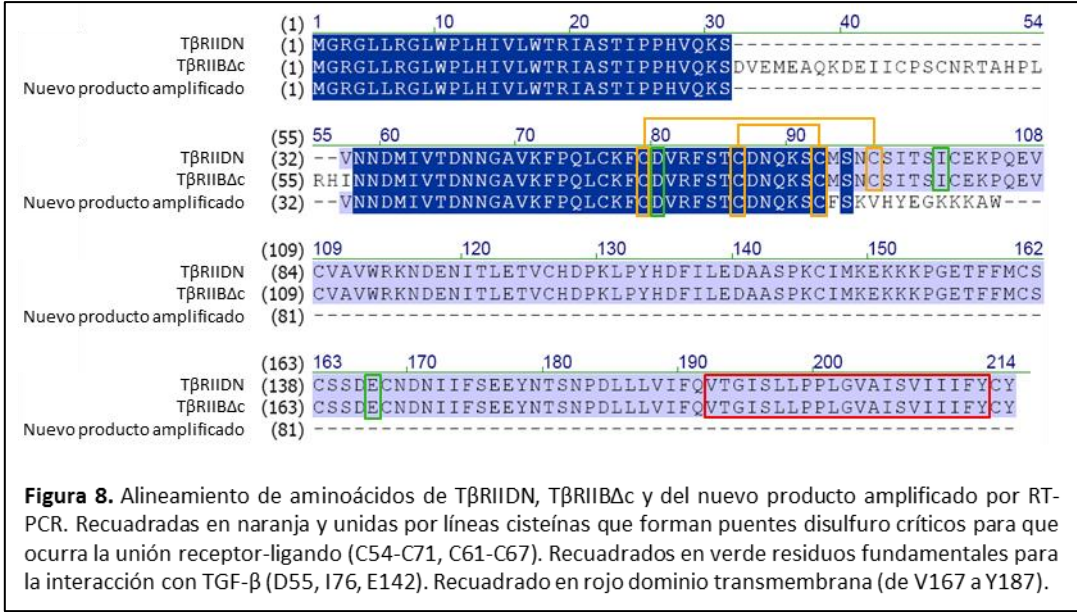
El alineamiento de nucleótidos obtenido con el programa Vector NTI Advance TM 10 (Invitrogen) muestra que el nuevo producto amplificado es similar a T β RII pero con una delección adicional de 149 nucleótidos en el dominio extracelular (delección de los últimos 62

nucleótidos del exón II y de los primeros 87 nucleótidos del exón III del gen *tgfb2*) (Figura 7). Para confirmar que no se tratara de un artefacto o de una variante sólo producida por linfocitos, la misma banda amplificada por RT-PCR a partir de ARNm de varios tipos celulares humanos se clonó en el vector pGEM-T Easy y se secuenció como se describe más arriba, de donde se obtuvo la misma secuencia nucleotídica que en linfocitos humanos. Estos resultados indican que el producto amplificado representa una nueva variante de *splicing* de β RII presente en células humanas.



A partir de las secuencias nucleotídicas de la nueva variante de *splicing* y de las otras dos variantes de β RII se pudieron predecir las secuencias de aminoácidos correspondientes, utilizando el programa Vector NTI Advance TM 10 (Invitrogen). El alineamiento de estas secuencias (Figura 8) muestra que, debido a la delección de 149 nucleótidos en el mensajero de la nueva variante de β RII, se produciría un cambio en el marco de lectura a partir del aminoácido 68. Este corrimiento del marco de lectura tendría como consecuencia la aparición prematura de un codón de terminación, lo que generaría una proteína truncada de sólo 80 aminoácidos carente del dominio transmembrana. Es importante resaltar que en esta proteína truncada predicha, 12 de los 13 aminoácidos de su extremo carboxilo terminal difieren respecto a los aminoácidos correspondientes en las otras dos isoformas de β RII. Además, se perderían sitios fundamentales para que ocurra la unión con TGF- β como el aminoácido 176 que contribuye a la afinidad de la unión a través de un contacto hidrofóbico con el ligando (De Crescenzo, G. *et al.*, 2006; Groppe, J. *et al.*, 2008; Baardsnes, J. *et al.*, 2009; Radaev, S. *et al.*, 2010), el aminoácido E142 que forma puentes de hidrógeno con R25 de TGF- β aumentando la

afinidad y determinando la especificidad de la unión (Hart, P. J. *et al.*, 2002; De Crescenzo, G. *et al.*, 2006; Baardsnes, J. *et al.*, 2009; Radaev, S. *et al.*, 2010) y el aminoácido C71 que forma un puente disulfuro con C54 del receptor necesario tanto para la unión del ligando como para la señalización posterior (Guimond, A. *et al.*, 2002).



Para determinar el peso molecular teórico de esta nueva proteína se analizó la secuencia de aminoácidos predicha para detectar y especificar sus modificaciones postraduccionales (Tabla 1). El análisis realizado con el programa SignalP (Petersen, T. N. *et al.*, 2011) permitió identificar la presencia de un péptido señal para secreción, cuyo sitio de corte se encontraría entre los aminoácidos 23 y 24. Además, se detectó la presencia de tres sitios de glicaciones en K46, K52 y K78 (programa NetGlycate, Johansen, M. B. *et al.*, 2006), tres sitios de fosforilaciones en S31, S59 e Y73 (programa NetPhos, Blom, N. *et al.*, 1999) y un sitio de pegado de la proteína SUMO en K46 (programa SUMOplot™, ABGENT, CA, USA). No se detectaron sitios de sulfonaciones, C-manosilaciones, O-GalNAC glicosilaciones, O-glicosilaciones, N-glicosilaciones, miristilaciones, ni de palmitoilaciones. Este estudio indicó que el peso molecular estimado de la proteína madura producida por la nueva variante de *splicing* de TβRII sería de 18.4 kDa.

Tipo de modificación	Ubicación de la modificación	Peso molecular (kDa)
Péptido señal	Sitio de corte entre T23 e I24	2.7
Glicación	K46, K52 y K78	0.6 (0.2 c/u)
Fosforilación	S31, S59 e Y73	0.3 (0.1 c/u)
Pegado de proteína SUMO	K46	11
Peso molecular teórico total		9.2
Peso molecular teórico sin péptido señal y con modificaciones		18.4

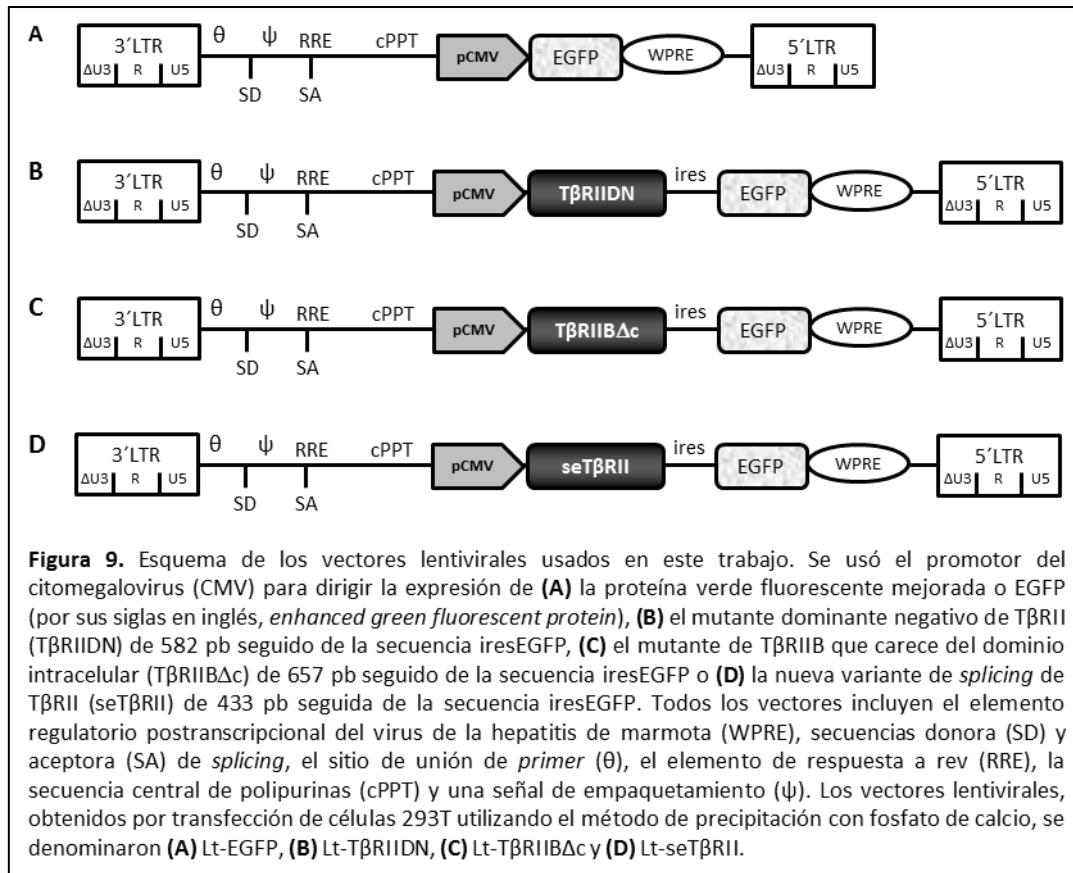
Tabla 1. Análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la nueva variante de *splicing* de TβRII.

La presencia del péptido señal y la carencia del dominio transmembrana sugieren que la nueva variante de *splicing* de TβRII produciría un receptor soluble endógeno. Por ello, a esta nueva variante se la denominó seTβRII.

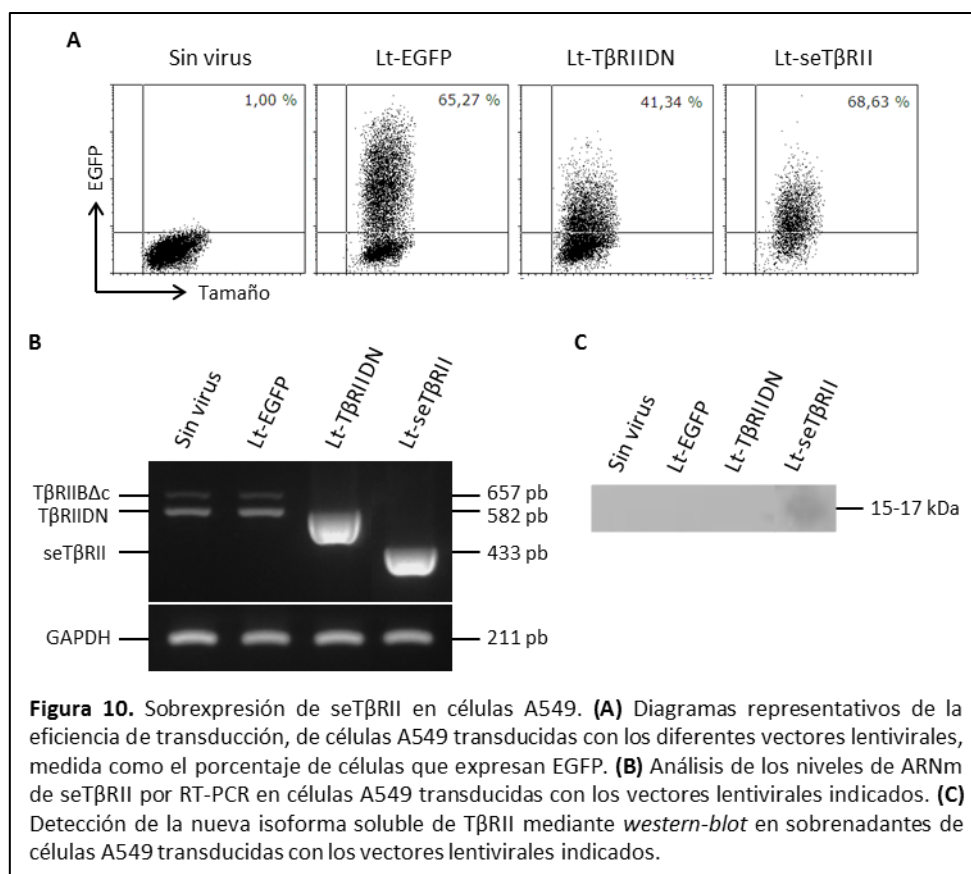
2. Sobreexpresión y detección de la nueva isoforma de TβRII en sobrenadantes de células A549

Se sabe que la concentración de receptores solubles endógenos es, generalmente, muy baja. Por lo tanto, su purificación a partir de fluidos corporales podría no generar cantidades suficientes para su caracterización (Rose-John, S. *et al.*, 1994). De hecho, en una primera instancia, intentamos evaluar la presencia de seTβRII en suero humano. Aun habiendo realizado una inmunoprecipitación previa del suero humano con el anticuerpo monoclonal TGFβ RII (C-4) (Santa Cruz Biotechnology), que reconoce los aminoácidos 1-567 (dominio N terminal) de TβRII de origen humano, para aumentar la cantidad de proteínas totales en la muestras de partida, no se pudo detectar la presencia de seTβRII en el fluido corporal mediante *western-blot* (resultados no mostrados).

Para poder determinar si seTβRII es secretada al medio extracelular se decidió, entonces, sobreexpresarla en células A549 que presentan niveles indetectables del ARNm de la nueva variante de *splicing* de TβRII por RT-PCR (resultados descriptos en el Capítulo 3). Para obtener la sobreexpresión se generaron vectores lentivirales autoinactivantes bicistrónicos (Figura 9) que contienen el ADNc de la nueva variante de *splicing* (Lt-seTβRII) o el de los otros dos mutantes de TβRII (Lt-TβRIIDN y Lt-TβRIIBΔc) y la secuencia que codifica para la proteína fluorescente verde mejorada o EGFP (por sus siglas en inglés, *enhanced green fluorescent protein*), corriente abajo del promotor fuerte del citomegalovirus (CMV). Como control se utilizó un vector lentiviral autoinactivante que contiene sólo la secuencia que codifica para EGFP bajo la acción del promotor del CMV.



Las células A549 se transdujeron con los vectores Lt-EGFP, Lt-TβRIIDN y Lt-seTβRII a una MOI=50, obteniendo una eficiencia de transducción de 46-65 %, 41-45 % y 69-81 %, respectivamente (Figura 10A). El aumento en los niveles de ARNm tanto de seTβRII como de TβRIIDN se confirmó mediante RT-PCR sólo en células transducidas con los respectivos vectores, Lt-seTβRII y Lt-TβRIIDN (Figura 10B). El análisis por *western-blot* de estas células, tanto transducidas con los diferentes vectores como sin transducir, muestra que sólo en el sobrenadante de células A549 transducidas con el vector Lt-seTβRII se puede detectar una banda tenue de 15-17 kDa (Figura 10C), lo que concuerda con el peso molecular teórico de 18.4 kDa estimado para seTβRII. Es importante resaltar que seTβRII sólo pudo ser observado en sobrenadantes de células A549 incubadas en presencia de inhibidores de proteasas en el medio de cultivo. Este resultado constituye la primera evidencia de la producción, por parte de células humanas, de una isoforma soluble y secretable del receptor tipo II de TGF-β.



3. Análisis funcional de seTβRII

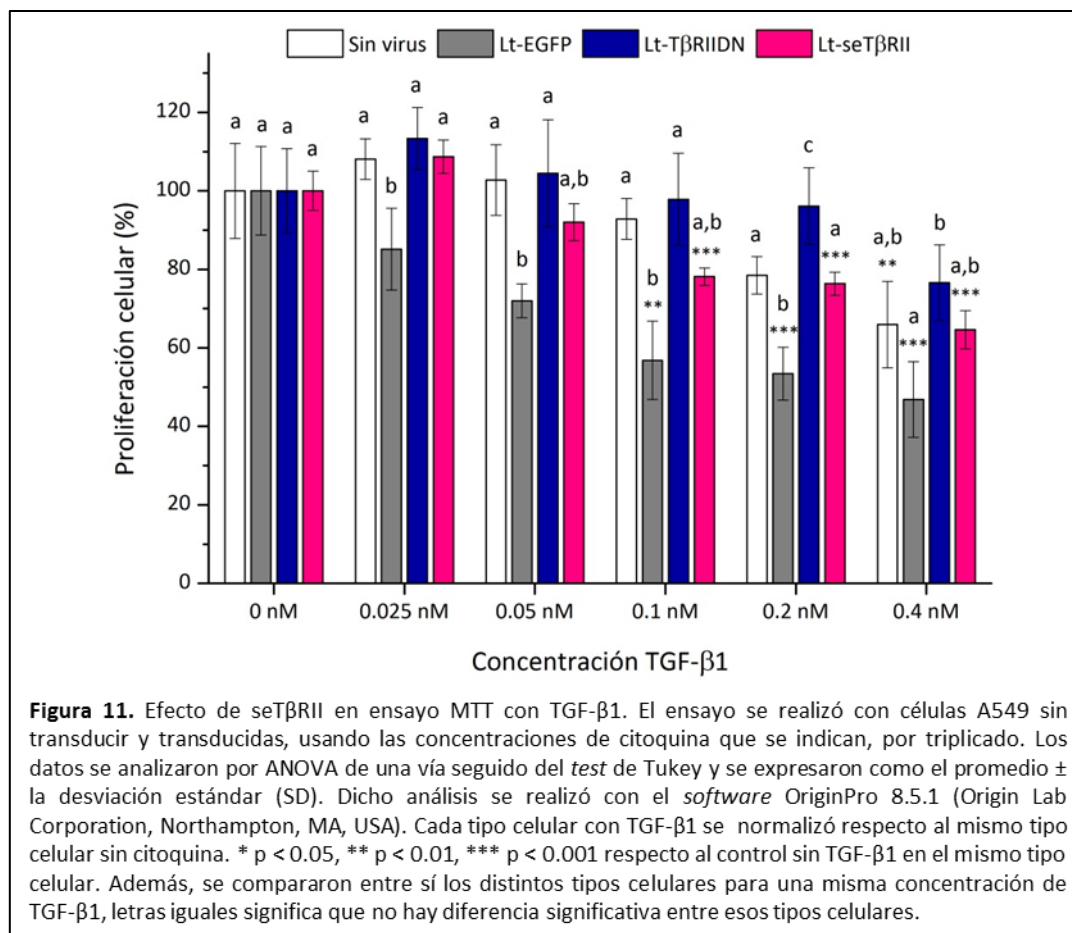
Con el fin de obtener datos que permitan determinar la probable función del nuevo receptor soluble seTβRII en células humanas, se evaluó la capacidad de seTβRII de revertir o de potenciar la inhibición de la proliferación celular producida por TGF-β1 o TGF-β2 en células A549 mediante ensayo MTT. Así, células A549 transducidas con el vector Lt-seTβRII y, como control, células sin transducir y transducidas con el vector Lt-EGFP y con el vector Lt-TβRIIDN, fueron crecidas durante 72 horas en presencia de concentraciones crecientes (0-0.4 nM) tanto de TGF-β1 como de TGF-β2.

Para TGF-β1 (Figura 11), se pudo observar que en células control sin transducir TGF-β1 inhibe la proliferación a una concentración de 0.4 nM, como se esperaba. Por otra parte, cuando se evaluó el efecto de TGF-β1 sobre células transducidas con el vector control Lt-EGFP, se observó que la inhibición de la proliferación celular comienza a una concentración menor (0.1 nM) y se mantiene hasta la máxima concentración de citoquina utilizada (0.4 nM). Esto sugiere que la modificación genética de las células provoca un aumento en la sensibilidad a TGF-β1. Estos resultados no son inesperados ya que se sabe (Kekow, J. *et al.*, 1990; Allen, J. B. *et al.*, 1991; Pal, S. *et al.*, 2004) que tanto en pacientes infectados con HIV como en cultivos celulares infectados *in vitro* con este virus, del cual derivan los vectores lentivirales usados en este trabajo, los niveles de TGF-β1 están aumentados comparados con los de individuos sanos o los

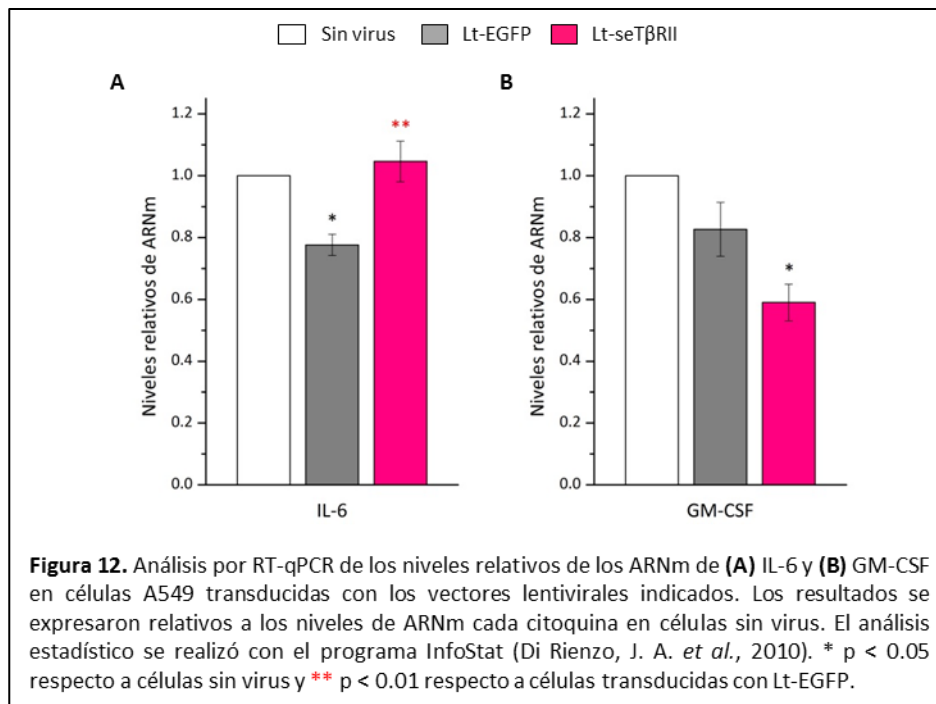
de células sin infectar. Esto indicaría que la sensibilidad incrementada a TGF- β 1 se debería a que el vector lentiviral aumenta los niveles endógenos de TGF- β 1.

Adicionalmente, cuando se evaluó el efecto de TGF- β 1 en células que sobreexpresan el mutante dominante negativo T β RIIDN, se observó que para todas las concentraciones ensayadas, las células fueron insensibles a TGF- β 1. Además, para todas las concentraciones de citoquina se revierte el efecto de inhibición de la proliferación celular observado en células transducidas con el vector Lt-EFGP. Estos resultados indican que, como se esperaba, T β RIIDN actúa como un antagonista de TGF- β 1.

A continuación, se especuló que si seT β RII fuera un antagonista de TGF- β 1 las células transducidas con Lt-seT β RII deberían ser insensibles a TGF- β 1 de modo similar a lo observado en células transducidas con Lt-T β RIIDN. Cuando se examinó el efecto de TGF- β 1 en células que sobreexpresan seT β RII se observó que las células son sensibles a la citoquina, lo que se percibió a través de una disminución significativa de la proliferación celular a partir de 0.1 nM de TGF- β 1 que se mantiene hasta la máxima concentración de citoquina utilizada (0.4 nM), comparado con las mismas células sin TGF- β 1 exógeno. Este resultado sugiere que seT β RII no estaría actuando como un antagonista de TGF- β 1. Por otra parte, si se compara el efecto de TGF- β 1 en células que sobreexpresan seT β RII con el efecto producido en células sin transducir, puede observarse que la inhibición estadísticamente significativa de la proliferación celular comienza a una concentración mucho menor (0.1 nM para células que sobreexpresan seT β RII frente a 0.4 nM para células sin transducir). Este resultado sugeriría que seT β RII estaría actuando como un agonista de TGF- β 1.



Para tener más datos que avalen la función asignada a seTβRII como un agonista de TGF-β1, se decidió evaluar si en células que sobreexpresan seTβRII el efecto de TGF-β1 endógeno sobre los niveles de ARNm de distintas citoquinas está potenciado. Se sabe que TGF-β1 aumenta los niveles de ARNm y de proteína de IL-6 (Benveniste, E. N. *et al.*, 1994; Schluns, K. S. *et al.*, 1997; Mazzei, P. *et al.*, 1998; Eickelberg, O. *et al.*, 1999) y disminuye los niveles de ARNm y de proteína de GM-CSF (Fadok, V. A. *et al.*, 1998; Kwon, Y. J. *et al.*, 2004; Rodríguez, T. M. *et al.*, resultados no publicados de nuestro laboratorio). Por lo tanto, se decidieron evaluar los niveles de ARNm de estas dos citoquinas en células transducidas con el vector Lt-seTβRII. Se pudo observar que los niveles de ARNm de IL-6 están disminuidos en células transducidas con el vector control Lt-EGFP, probablemente debido al vector lentiviral, y que en células transducidas con el vector Lt-seTβRII se restablecen los niveles de ARNm de IL-6 obtenidos en células sin transducir (Figura 12A). Para el caso de GM-CSF, los niveles de ARNm de la citoquina son similares tanto en células sin transducir como en células transducidas con el vector control. Contrariamente, en células que sobreexpresan seTβRII los niveles de ARNm de GM-CSF se encuentran disminuidos, de manera significativa, con respecto a los controles (Figura 12B). En conjunto, estos resultados brindan elementos adicionales que sustentan la hipótesis de que seTβRII actuaría como un agonista de TGF-β1.



Por otra parte, mediante ensayo para determinación de la proliferación celular, se evaluó si seTβRII puede actuar como antagonista o agonista de TGF-β2 (Figura 13).

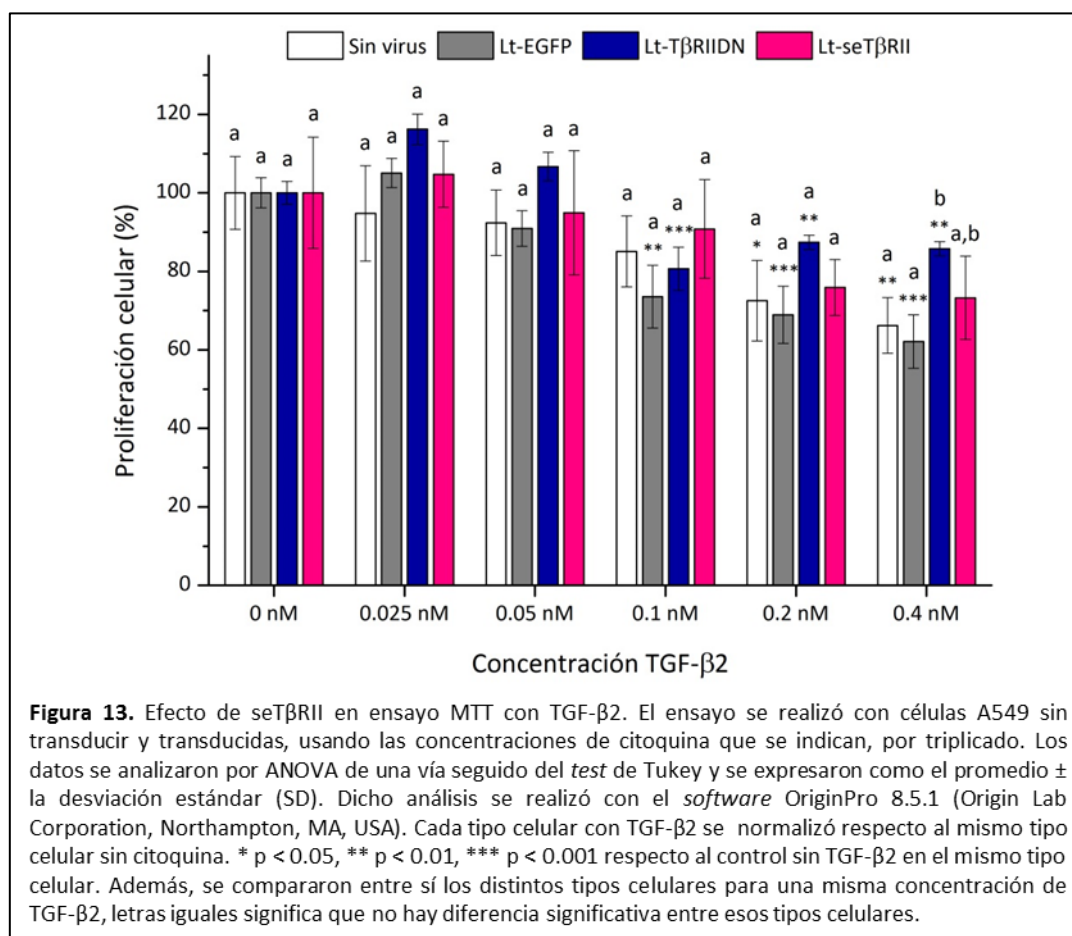
El ensayo reveló que en células sin transducir el efecto de inhibición de la proliferación comienza a ser significativo a una concentración de TGF-β2 de 0.2 nM, comparado con las mismas células en ausencia de TGF-β2 exógeno, y se mantiene hasta la última concentración de citoquina ensayada (0.4 nM). Esto indica que las células A549 son sensibles a TGF-β2.

Por otra parte, células transducidas con el vector control Lt-EGFP muestran un aumento significativo en la inhibición de la proliferación celular a partir de 0.1 nM de TGF-β2, comparado con las mismas células en ausencia de TGF-β2 exógeno. Es importante mencionar que los niveles de inhibición de la proliferación tanto en células sin transducir como en células transducidas con el vector Lt-EGFP permanecen similares en todas las concentraciones de TGFβ-2 utilizadas. El hecho de que ambos tipos celulares se comporten de igual manera no es inesperado ya que se sabe que los niveles de TGF-β2 no se ven aumentados ni en pacientes infectados con HIV ni en cultivos celulares infectados *in vitro* con este virus, comparados con los de individuos sanos o los de células sin infectar (Kekow, J. *et al.*, 1990; Allen, J. B. *et al.*, 1991; Pal, S. *et al.*, 2004).

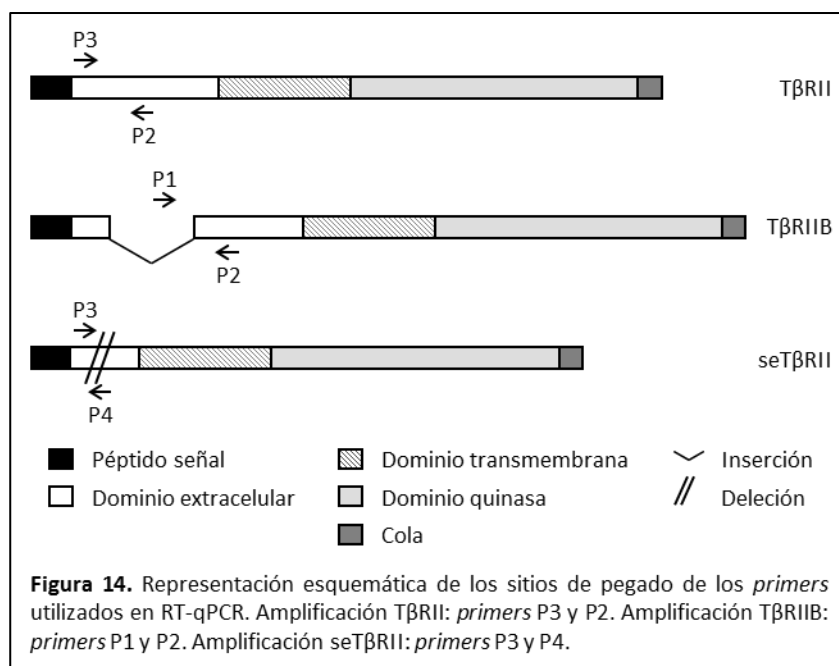
Con respecto a TβRIIDN, su sobreexpresión no hace a las células insensibles a TGF-β2 ya que puede observarse que la proliferación celular comienza a disminuir a una concentración de 0.1 nM de TGF-β2.

Cuando se evaluó el efecto de seTβRII sobre la proliferación celular, no se observaron diferencias con respecto a células sin transducir ni a células transducidas con el vector Lt-EGFP,

para iguales concentraciones de citoquina. Este resultado sugiere que seTβRII no tendría interacción con TGF-β2, al menos en las condiciones ensayadas.



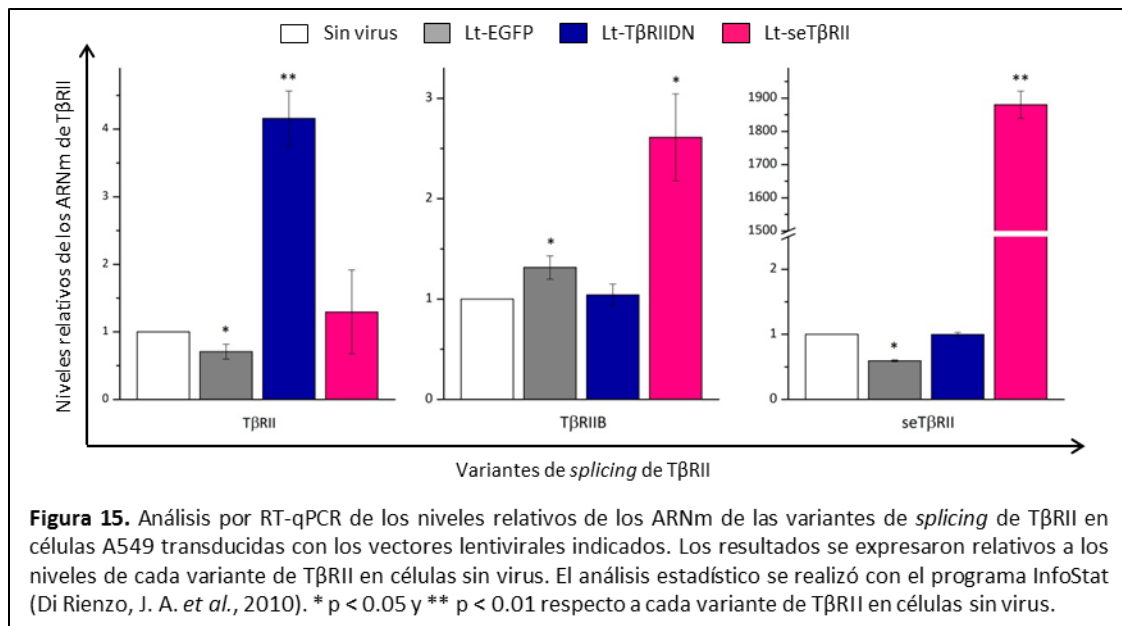
Para evaluar si la sobreexpresión de seTβRII produce algún cambio en la expresión de los receptores TβRII y TβRIIB, que pueda enmascarar los resultados obtenidos sobre la funcionalidad del nuevo receptor, se analizaron mediante RT-qPCR los niveles de ARNm de los tres receptores en células A549 transducidas y sin transducir. En la Figura 14 se muestra un esquema de los sitios de pegado de los *primers* empleados en RT-qPCR, que permiten amplificar las tres variantes de TβRII.



Los resultados del análisis de las variantes de TβRII en células A549 transducidas y sin transducir se muestran en la Figura 15. Se pudo observar que en células transducidas con Lt-seTβRII la sobreexpresión de seTβRII es de alrededor de 1900 veces con respecto a células sin transducir o transducidas con los otros vectores, lo que demuestra los elevados niveles de ARNm presentes. Por otra parte, se observó que la sobreexpresión de seTβRII no afecta los niveles de ARNm de TβRII, que es el receptor principal por medio del cual señala TGF-β1. Este resultado sugiere que el efecto agonista descrito anteriormente se debe a la sobreexpresión de seTβRII y no a una regulación positiva de TβRII. Además, la sobreexpresión de seTβRII produjo un incremento en los niveles de ARNm de TβRIIB (2.5 veces), resultado que sugiere un efecto de regulación positiva de TβRIIB por parte de seTβRII.

Por otra parte, no se pudieron observar cambios en los niveles de ARNm de TβRIIB ni de seTβRII en células que sobreexpresan el mutante TβRIIDN, lo que indica que el efecto antagonista detectado se debe a la acción del mutante dominante negativo.

Por último, en células transducidas con el vector control Lt-EGFP no se observaron cambios drásticos en los niveles de ARNm de ninguna de las tres variantes de TβRII estudiadas, con respecto a lo que ocurre en células sin transducir.



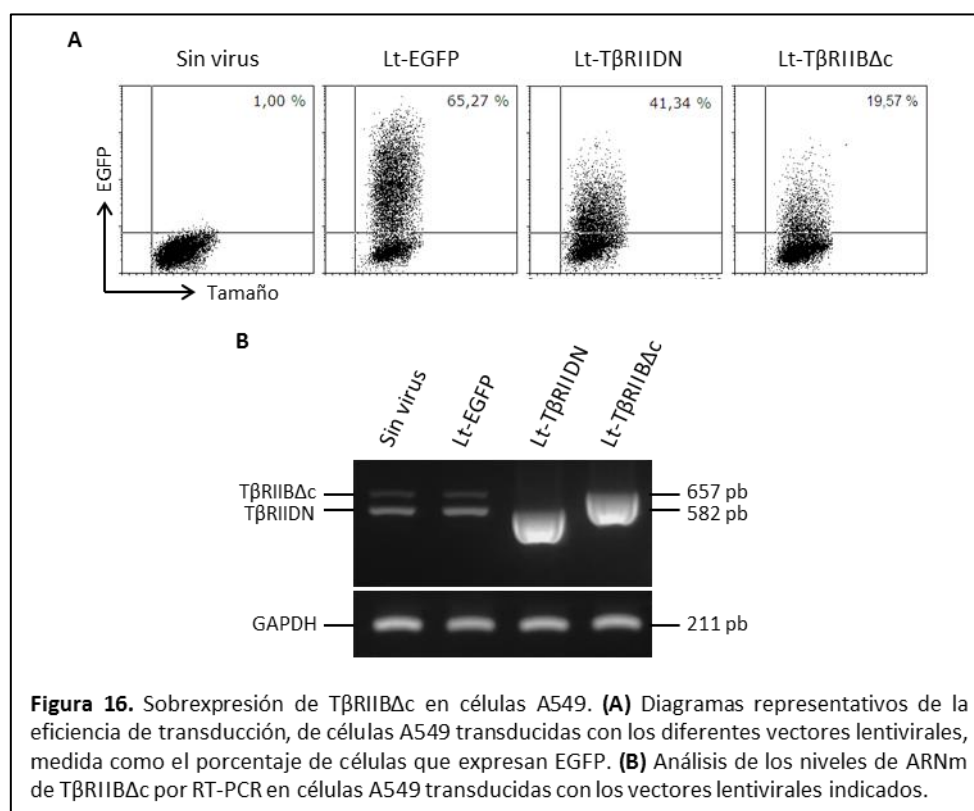
-Capítulo 2-

Caracterización de un nuevo mutante del receptor T β RIIB

1. Sobreexpresión del nuevo mutante de T β RIIB en células A549

Si bien las características de mutante dominante negativo de T β RIIDN son conocidas, hasta el momento se desconoce si T β RIIB carente de la región intracelular (T β RIIB Δ c) puede actuar como un mutante dominante negativo. Para investigarlo, se decidió sobreexpresarlo en la línea celular A549 y evaluar su efecto sobre la proliferación celular en presencia de distintas concentraciones de TGF- β 1 o TGF- β 2.

Para ello, se transdujeron células A549 con los vectores Lt-EGFP, Lt-T β RIIDN y Lt-T β RIIB Δ c, descritos anteriormente (Figura 9), cuya eficiencia de transducción se muestra en la Figura 16A. La confirmación del aumento de los niveles de ARNm de T β RIIB Δ c, en células transducidas con el vector Lt-T β RIIB Δ c, se realizó mediante RT-PCR (Figura 16B).

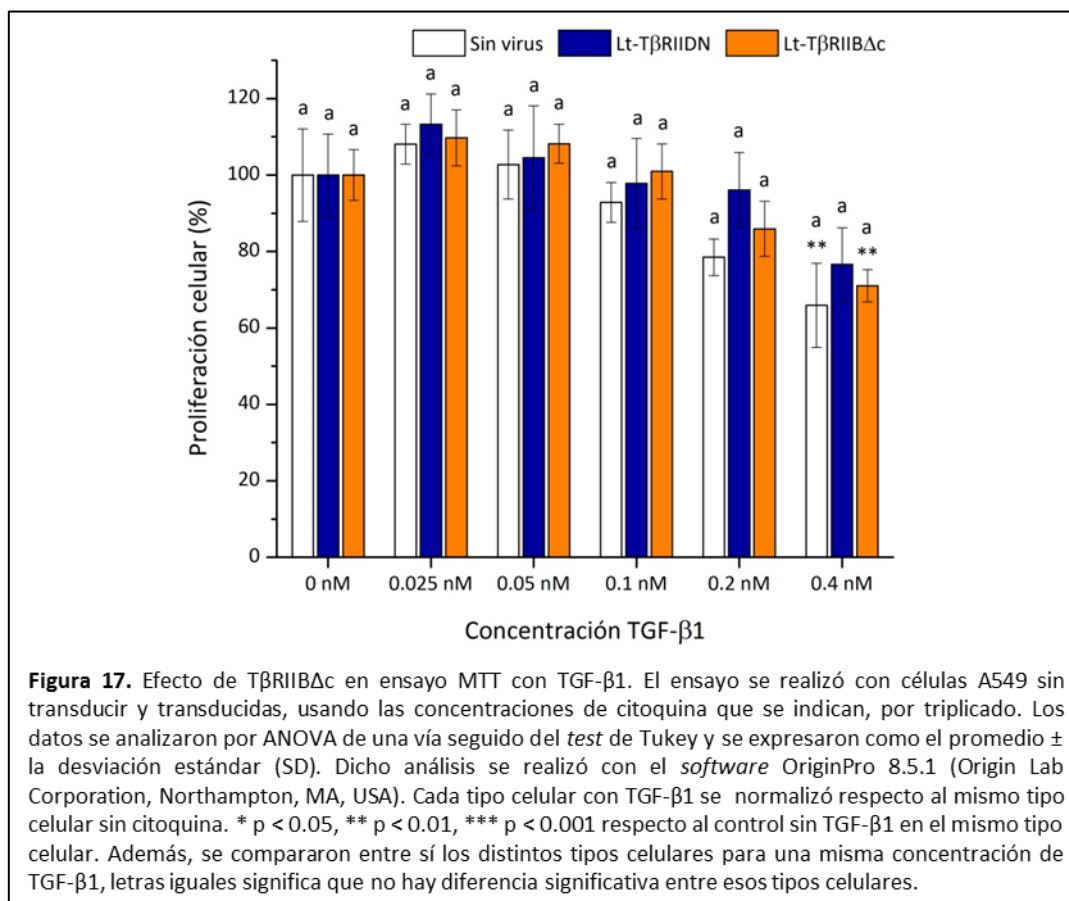


2. Análisis funcional de T β RIIB Δ c

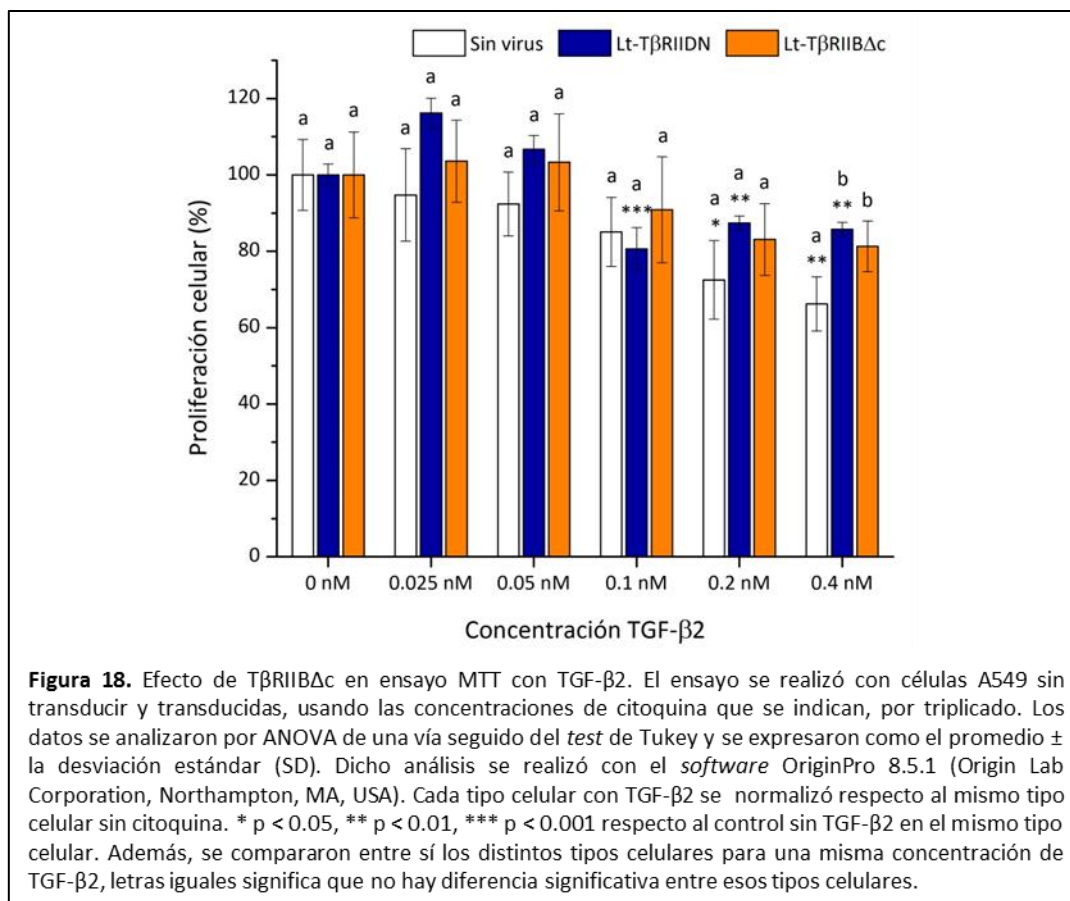
Una vez confirmada la sobreexpresión de T β RIIB Δ c, se utilizaron estas células para evaluar la capacidad del receptor mutante de revertir la inhibición de la proliferación celular producida por TGF- β 1 o TGF- β 2. Para ello, células transducidas con los vectores lentivirales Lt-T β RIIDN y Lt-T β RIIB Δ c y sin transducir fueron crecidas durante 72 horas en presencia de concentraciones crecientes (0-0.4 nM) de una u otra citoquina.

Si T β RIIB Δ c funcionara como un receptor dominante negativo de TGF- β 1, la reversión de la inhibición de la proliferación en células transducidas con Lt-T β RIIB Δ c debería ser similar a la

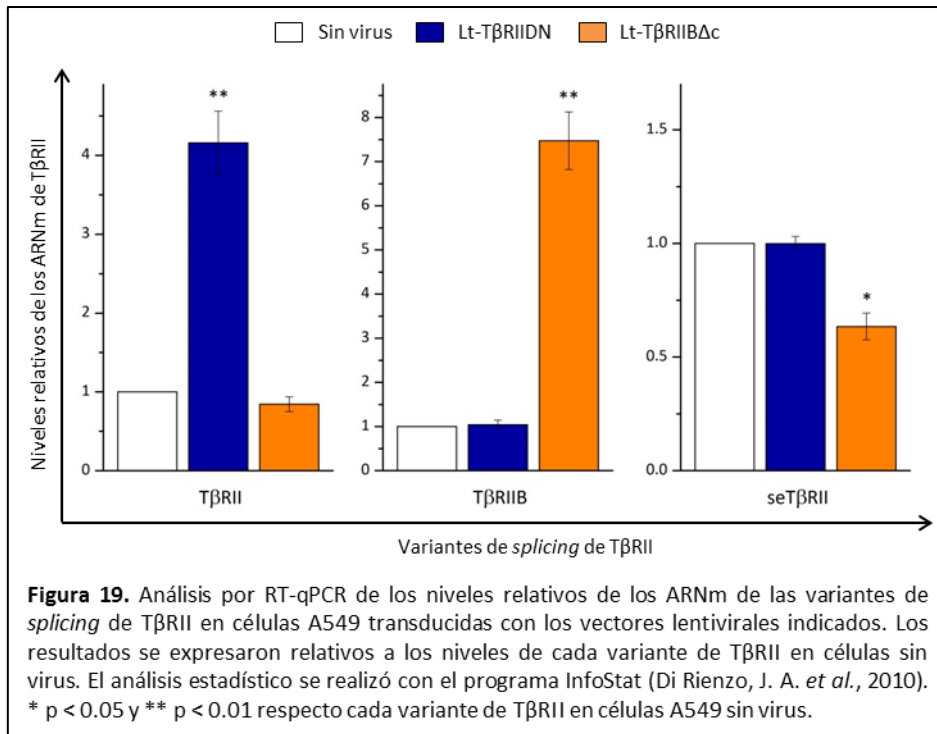
obtenida en células transducidas con Lt-T β RIIDN. Como puede observarse (Figura 17), células que sobreexpresan T β RIIB Δ c, para todas las concentraciones de citoquina ensayadas, se comportan de igual manera que las células que sobreexpresan T β RIIDN. La disminución de la proliferación celular observada para 0.4 nM de TGF- β 1 en células transducidas con Lt-T β RIIB Δ c, respecto a la de las mismas células en ausencia de citoquina exógena, podría deberse a la baja eficiencia de transducción obtenida con este vector lentiviral (sólo 20 % de células EGFP⁺). Por lo tanto, la sobreexpresión del nuevo mutante de T β RIIB convierte a las células en insensibles a TGF- β 1, es decir, al igual que T β RIIDN, T β RIIB Δ c actuaría como un antagonista de la citoquina.



Del mismo modo, mediante ensayo para determinación de la proliferación celular, se evaluó si T β RIIB Δ c funciona como un receptor dominante negativo de TGF- β 2 (Figura 18). Se pudo observar que TGF- β 2 no produce disminución de la proliferación de células que sobreexpresan T β RIIB Δ c en ninguna de las concentraciones ensayadas, lo que se contrapone a lo que ocurre en células que sobreexpresan el mutante T β RIIDN. Estos resultados sugieren que, a diferencia de T β RIIDN, T β RIIB Δ c sería un antagonista tanto de TGF- β 1 como de TGF- β 2.



Del mismo modo, para evaluar si los efectos observados en los estudios de proliferación se deben a la sobreexpresión de TβRIIBΔc y no a una regulación de los otros dos receptores tipo II de TGF-β, se analizaron mediante RT-qPCR los niveles de ARNm de los tres receptores en células A549 transducidas y sin transducir (Figura 19). Se observó que en células transducidas con Lt-TβRIIBΔc los niveles de ARNm de TβRIIBΔc son 7.5 veces mayores que los de células sin transducir o transducidas con el vector Lt-TβRIIDN, lo que demuestra el incremento en los niveles de ARNm debido a la sobreexpresión del transgén. Además, se pudo observar que la sobreexpresión de TβRIIBΔc produce una disminución en los niveles de ARNm de seTβRII de alrededor de 1.5 veces, comparados con los de células sin transducir; mientras que no tiene efecto significativo sobre la expresión de TβRII.



-Capítulo 3-

Evaluación del perfil de ARNm de las distintas variantes de T β RII en células humanas y de su utilidad como biomarcadores de artritis reumatoidea

1. Evaluación de los niveles de ARNm de las distintas variantes de TβRII en líneas celulares

Con el objetivo de obtener indicios sobre la posible implicancia de cada una de las variantes de *splicing* de TβRII en la función celular, en este capítulo evaluamos si el perfil de ARNm de estas variantes presenta un tipo de patrón diferencial dependiente del tipo celular.

Inicialmente, se estudiaron los niveles de ARNm de las variantes de TβRII en líneas celulares provenientes de tumores, en células immortalizadas con virus y en cultivos primarios de células normales no inmunes. De particular importancia son las células tumorales ya que se sabe que las alteraciones en la vía de señalización de TGF-β que incluyen mutaciones o deleciones y la resistencia a la inhibición de la proliferación por TGF-β son frecuentes en cánceres humanos.

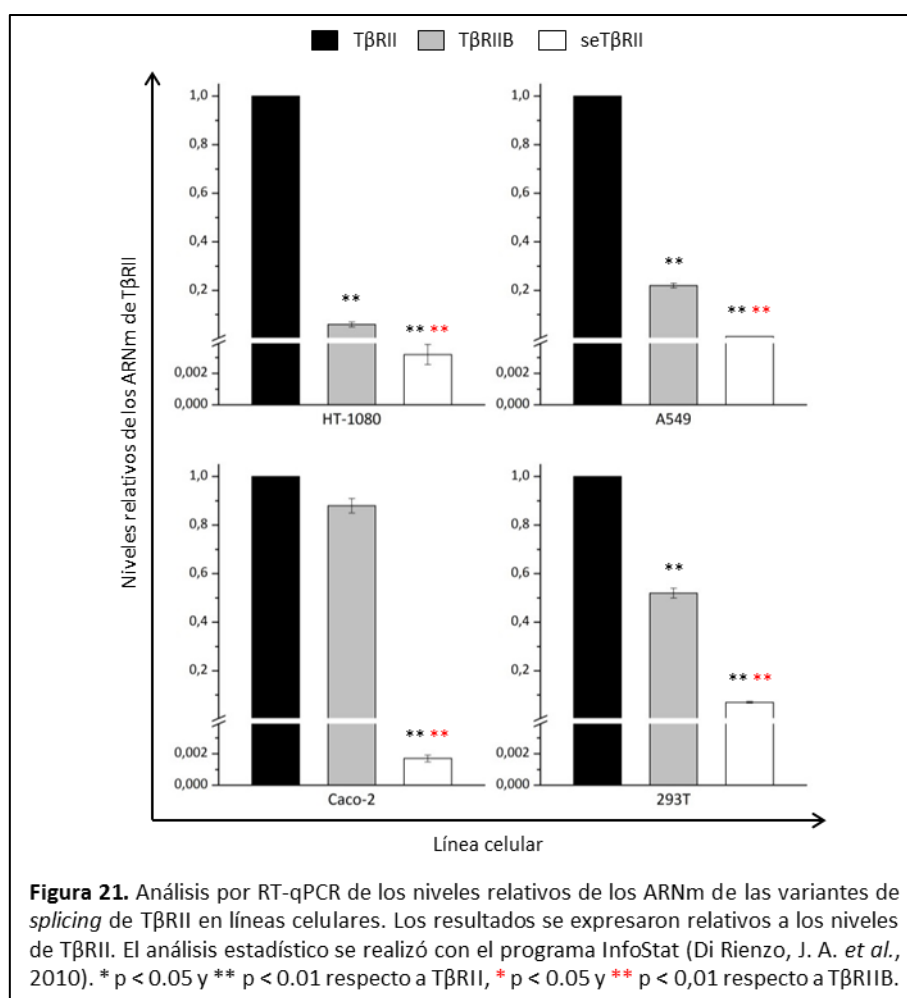
Para detectar la presencia de las variantes de *splicing* de TβRII en las distintas líneas celulares y cultivos primarios, se purificó su ARN total, se amplificó mediante RT-PCR utilizando los *primers* que permiten detectar las tres variantes de *splicing* de TβRII (Figura 6) y, finalmente, los productos de la amplificación se separaron en gel de agarosa al 1.5 %. En este estudio se analizaron las líneas celulares de tumores sólidos humanos: HT-1080 (fibrosarcoma), A549 (adenocarcinoma de pulmón), Caco-2 (adenocarcinoma colorrectal) y Hep 3B (carcinoma hepatocelular); de tumor líquido humano: Jurkat (leucemia linfoide aguda); líneas celulares humanas immortalizadas utilizando genes exógenos: 293T (células humanas embrionarias de riñón immortalizadas con el antígeno T de SV40), HEK-293 (células humanas embrionarias de riñón immortalizadas con la proteína E1A de adenovirus) y una línea de células linfoblastoides humanas transformadas con el virus de Epstein-Barr (EBV-LCL); y un cultivo primario de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (hASC, pasaje 6) (Figura 20). De este modo, se pudo observar que todos los tipos celulares analizados expresan ARNm de TβRII y TβRIIB y que TβRII constituye la variante mayoritaria en ocho de los nueve tipos celulares estudiados. En células HEK-293 se encontraron niveles de ARNm de TβRII y de TβRIIB muy disminuidos, mientras que seTβRII fue la variante mayoritaria en esta línea celular. Con respecto al ARNm de seTβRII se pudo observar que, mediante la técnica utilizada, esta variante está ausente sólo en células derivadas de tumores sólidos.



Para evaluar si el ARNm de seTβRII está ausente en células derivadas de tumores sólidos, como sugiere la detección por RT-PCR cualitativa, o si los niveles son tan bajos que no pueden ser

detectados por esa técnica, se cuantificaron los niveles de las tres variantes de *splicing* de T β RII mediante RT-qPCR en algunas líneas celulares tumorales. Como control se utilizó la línea celular 293T que expresa niveles detectables de la variante seT β RII por RT-PCR cualitativa.

Si bien la variante seT β RII pudo detectarse en todas las líneas celulares derivadas de tumores sólidos, sus niveles fueron extremadamente bajos (Figura 21). Respecto a T β RII, el ARNm de seT β RII se encuentra 312 veces disminuido en la línea celular HT-1080, 100 veces disminuido en la línea A549 y 588 veces disminuido en la línea celular Caco-2. En la línea celular control 293T, los niveles de seT β RII están disminuidos sólo 14 veces respecto a T β RII. Estos resultados indican que las líneas tumorales analizadas expresan seT β RII pero a niveles muy bajos como para poder ser detectados por RT-PCR cualitativa. Además, se pudo observar que en la mayoría de las líneas tumorales analizadas por RT-qPCR, así como en la no tumoral, la variante de *splicing* mayoritaria siempre fue T β RII; excepto por la línea Caco-2 donde se observaron niveles relativos de ARNm similares entre T β RII y T β RIIB.

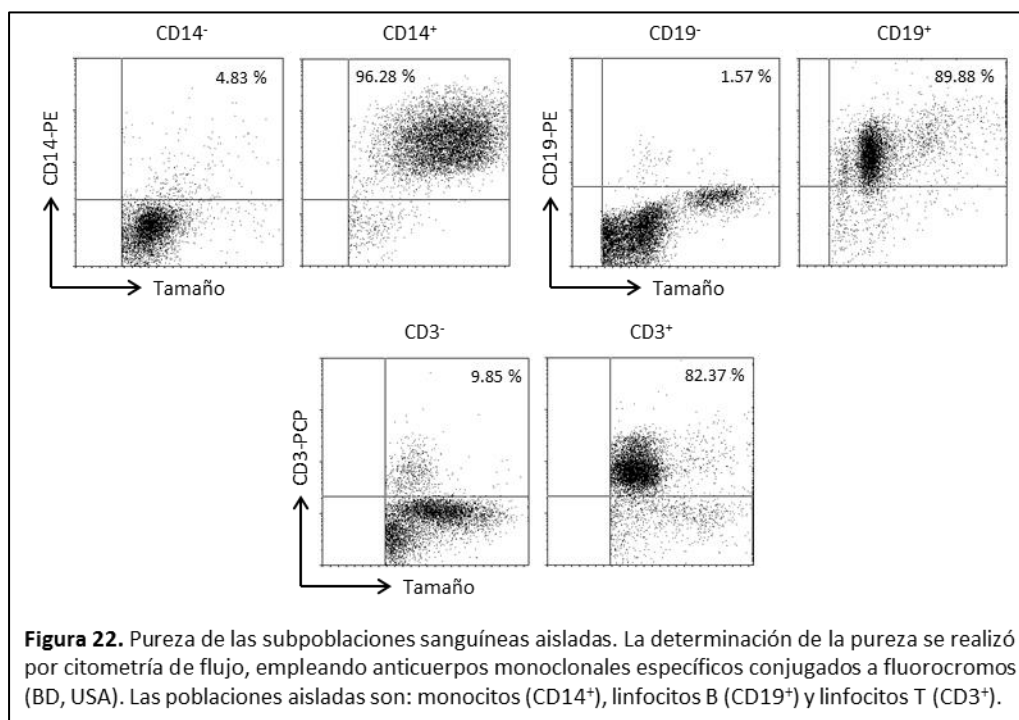


2. Evaluación de los niveles de ARNm de las distintas variantes de T β RII en poblaciones leucocitarias

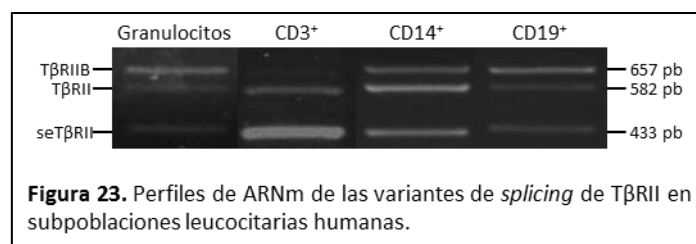
A continuación, y debido a que se sabe que TGF- β ejerce diferentes efectos sobre células del sistema inmune, nos propusimos ampliar la evaluación de los niveles de ARNm de las variantes de *splicing* de T β RII a distintas subpoblaciones sanguíneas humanas. Para ello, se purificaron granulocitos, monocitos, linfocitos B y linfocitos T totales de sangre periférica humana.

La purificación inicial se basó en la separación de las células mononucleares de los granulocitos y eritrocitos mediante gradiente con Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB). A partir del *pellet* obtenido luego del gradiente se purificaron los granulocitos mediante lisis de los eritrocitos con KCl 0.6 M. Este método permitió una recuperación de granulocitos, con una pureza de, aproximadamente, el 95 %.

Por otra parte, a partir de la fracción de células mononucleares se obtuvieron monocitos, linfocitos B y linfocitos T por medio de inmunoseparación magnética utilizando anticuerpos específicos. Estas subpoblaciones se purificaron empleando un Separador MiniMACS (Miltenyi Biotec), como se describe en la sección 2. 3. 1. 2. de materiales y métodos. La pureza de las subpoblaciones aisladas (monocitos CD14⁺, linfocitos B CD19⁺ y linfocitos T CD3⁺), determinada por citometría de flujo, varió entre 82 % y 96 % (Figura 22).



El análisis por RT-PCR cualitativa mostró que las tres variantes de T β RII están presentes en todas las poblaciones de leucocitos analizadas (Figura 23). Granulocitos y linfocitos B presentan un patrón similar, donde la variante mayoritaria parecería ser T β RIIB. Los linfocitos T muestran elevados niveles de ARNm de seT β RII y muy bajos de T β RIIB. Finalmente, el patrón observado en monocitos es más homogéneo, donde el ARNm de T β RII parecería estar levemente aumentado respecto al de las otras dos variantes del receptor.

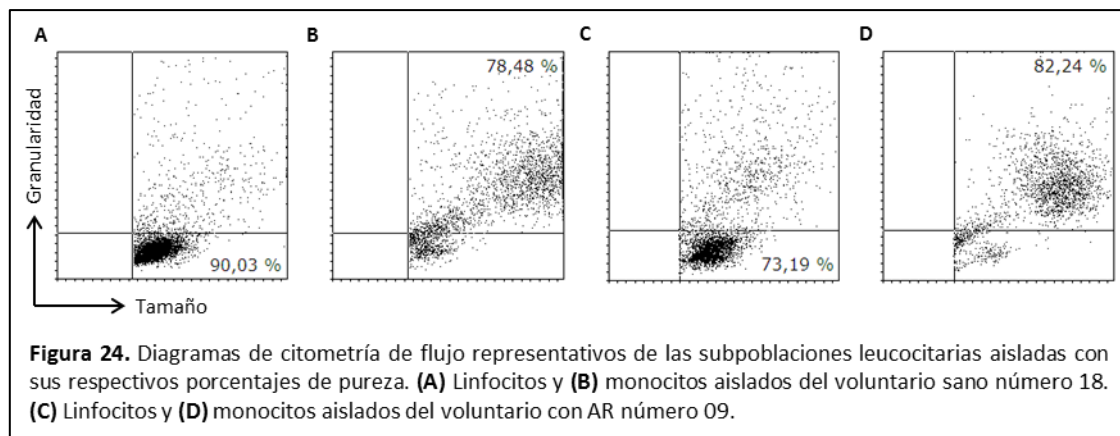


Para confirmar si los perfiles de ARNm de las distintas variantes de *splicing* de TβRII en las diferentes poblaciones de leucocitos, detectados por RT-PCR, son representativos de cada tipo celular, se determinó el mismo perfil por RT-qPCR en glóbulos blancos de nueve voluntarios sanos (VS). Además, para evaluar si estos perfiles podrían variar en una enfermedad autoinmune, se los comparó con los perfiles de nueve voluntarios con artritis reumatoidea (AR). De estas muestras, los granulocitos se purificaron a partir del *pellet* obtenido luego del gradiente de con Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB) mediante lisis de los eritrocitos, como se mencionó anteriormente. Luego del gradiente, las células mononucleares se incubaron 2 horas en medio RPMI suplementado con 10 % de SH y, posteriormente, se colectó el sobrenadante con los linfocitos (no adherentes al plástico). Se continuó con la incubación y, al otro día, se obtuvieron los monocitos (adherentes al plástico). La pureza de estas dos poblaciones de células mononucleares se determinó por citometría de flujo, haciendo uso de la granularidad celular (expresada como la dispersión lateral de la luz o SSC) y del tamaño celular (expresada como la dispersión frontal de la luz o FSC). La misma varió entre 64 % y 92 % para linfocitos de VS, entre 53 % y 84 % para monocitos de VS, entre 52 % y 87 % para linfocitos de voluntarios con AR y entre 36 % y 89 % para monocitos de voluntarios con AR (Tabla 2).

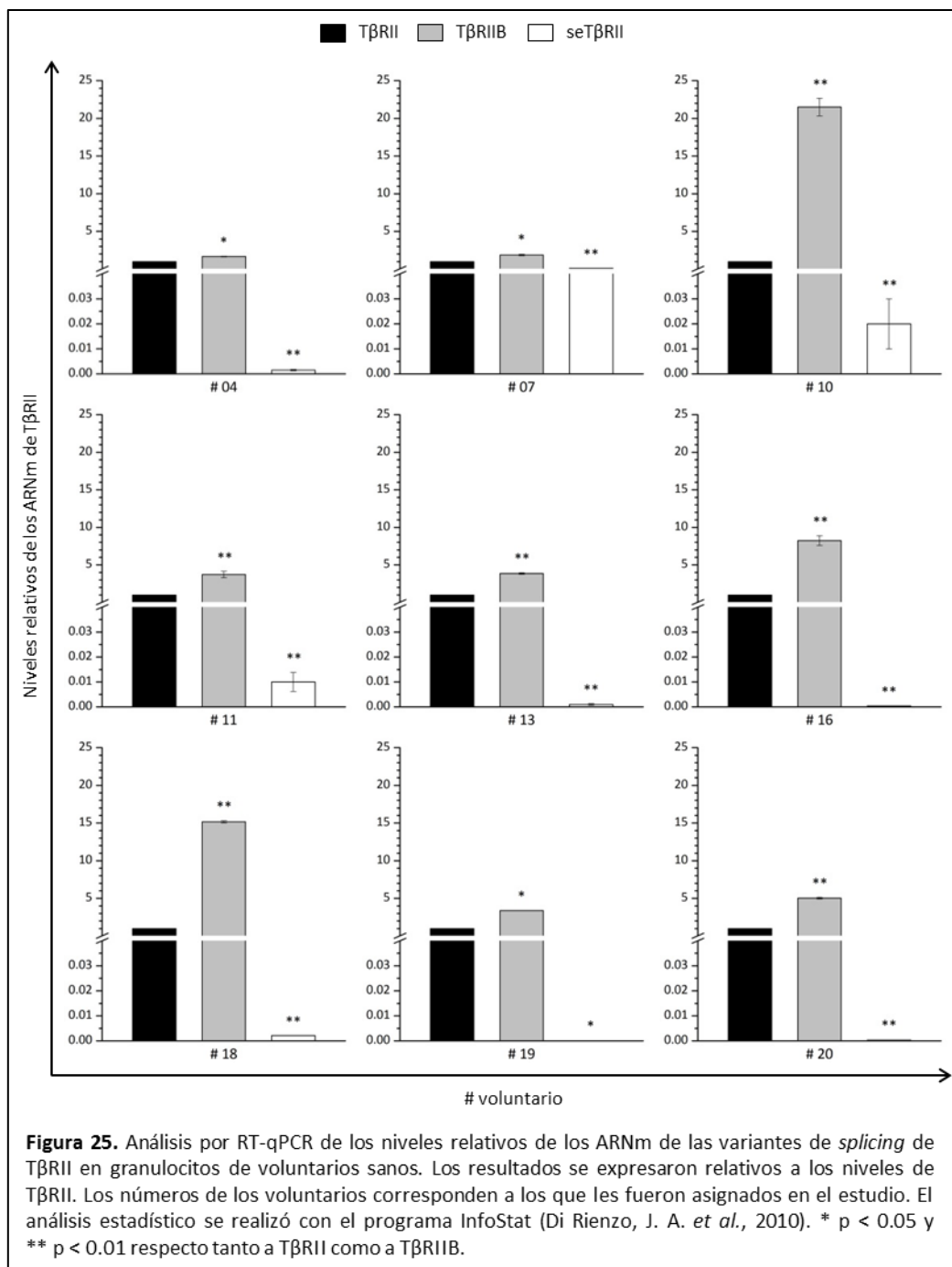
N° y sexo voluntarios		Pureza linfocitos (%)		Pureza monocitos (%)	
VS	AR	VS	AR	VS	AR
04, F	03, F	63.70	51.77	52.52	58.63
07, M	06, M	92.24	78.96	66.83	43.31
10, M	09, M	79.92	73.19	84.29	82.24
11, F	12, F	81.67	74.37	83.15	67.48
13, F	14, F	84.16	83.80	71.88	89.35
16, F	15, F	89.27	82.02	77.30	77.89
18, F	08, F	90.03	73.59	78.48	35.84
19, F	17, F	90.86	86.88	67.73	81.77
20, F	05, F	69.89	71.49	79.92	69.15

Tabla 2. Pureza de linfocitos y monocitos, aislados a partir de sangre periférica de voluntarios sanos (VS) y de voluntarios con AR (AR), determinada por citometría de flujo. Los números de los voluntarios corresponden a los que les fueron asignaron en el estudio. F: femenino; M: masculino. Se muestran en una misma fila un VS y un AR apareados por mismo sexo y edades similares.

En la Figura 24 se muestran diagramas de citometría de flujo representativos de la pureza de estas subpoblaciones leucocitarias.

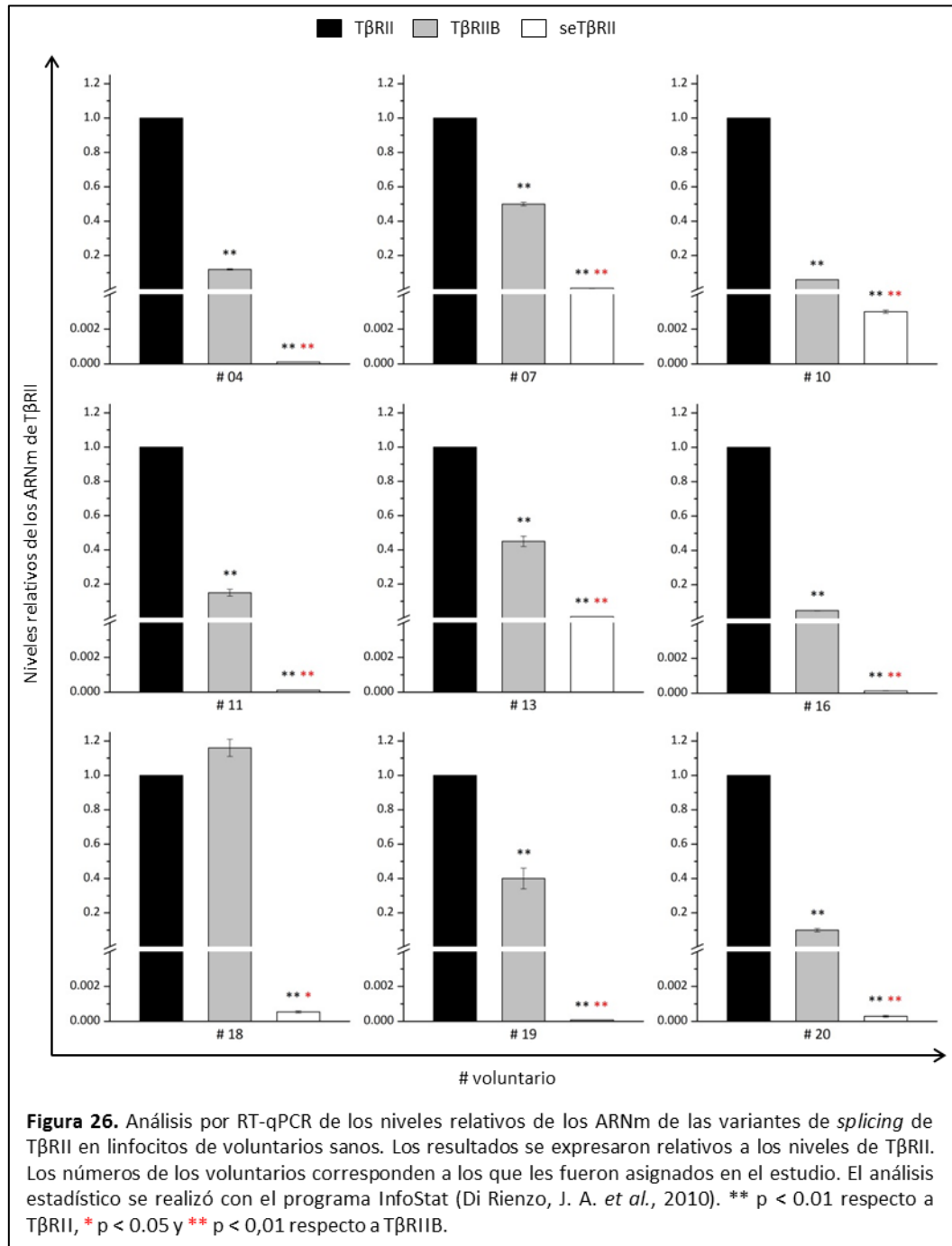


El análisis cuantitativo del perfil de ARNm de las distintas variantes de *splicing* en granulocitos de voluntarios sanos (Figura 25) mostró que en todos los casos $\text{set}\beta\text{RII}$ es la variante minoritaria (disminuida entre 10 y 27 780 veces respecto a $\text{T}\beta\text{RII}$) y que $\text{T}\beta\text{RIIB}$ es la variante de *splicing* mayoritaria, cuyos niveles son significativamente mayores que los de $\text{T}\beta\text{RII}$. Esto concuerda con nuestro análisis inicial de granulocitos mediante RT-PCR cualitativa e indicaría un perfil de transcripción de las distintas variantes de *splicing* de $\text{T}\beta\text{RII}$ específico de granulocitos de voluntarios sanos.



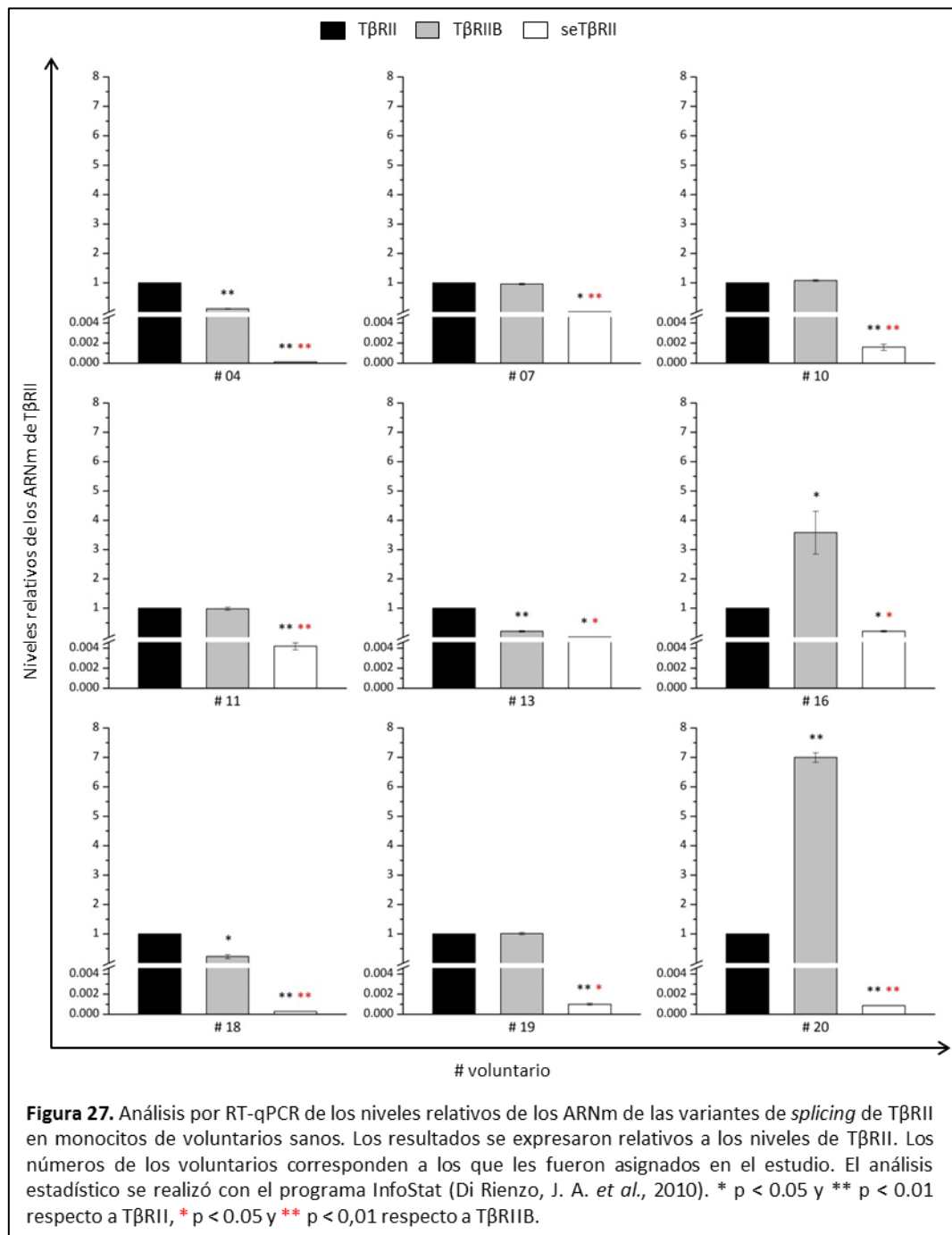
En el análisis realizado sobre linfocitos totales de voluntarios sanos (Figura 26), en ocho de los nueve voluntarios se observó que TβRII es la variante predominante, excepto para uno de los voluntarios donde no hay diferencia significativa entre el ARNm de TβRII y el de TβRIIB. Este perfil se asemeja al patrón de linfocitos T (CD3⁺) y no al de linfocitos B (CD19⁺), obtenidos mediante RT-PCR cualitativa, donde la expresión de TβRII es mayoritaria respecto a la de TβRIIB. Este resultado no es inesperado ya que de los linfocitos totales circulantes la mayoría (70-80 %) son linfocitos T. Nuevamente, en el análisis por RT-qPCR, seTβRII constituye la variante menos abundante del receptor (disminuida entre 100 y 12 990 veces respecto a TβRII), hecho que no se condice con el resultado observado por RT-PCR cualitativa. Como en

granulocitos, se pudo observar un perfil específico de tipo celular para linfocitos T de voluntarios sanos, pero en este caso la variante de *splicing* mayoritaria es T β RII.



En monocitos de voluntarios sanos (Figura 27), por el contrario, no pudo observarse un perfil de ARNm de las distintas variantes de T β RII reproducible. En cuatro de las nueve muestras analizadas los niveles de ARNm de T β RII y T β RIIB fueron equivalentes, en tres de las nueve muestras T β RII es la variante de *splicing* mayoritaria y en dos de las nueve muestras la variante mayoritaria es T β RIIB. Esta variación en los niveles de ARNm de las variantes T β RII y T β RIIB entre las distintas muestras de monocitos no depende de la diferente pureza de las mismas.

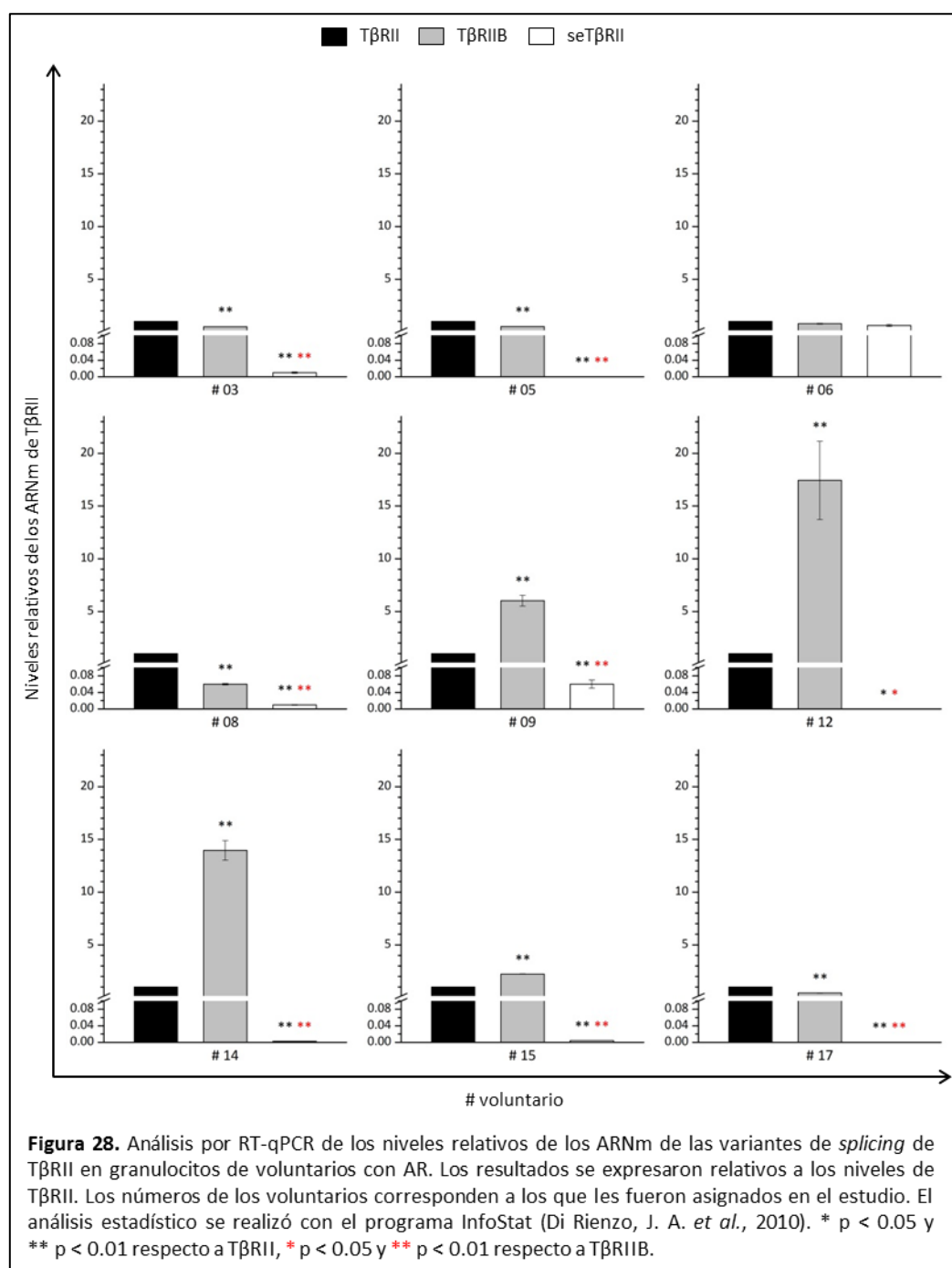
Con respecto a seT β RII, y al igual que lo observado en granulocitos y linfocitos, constituye la variante con menores niveles de expresión (disminuida entre 5 y 7690 veces respecto a T β RII).



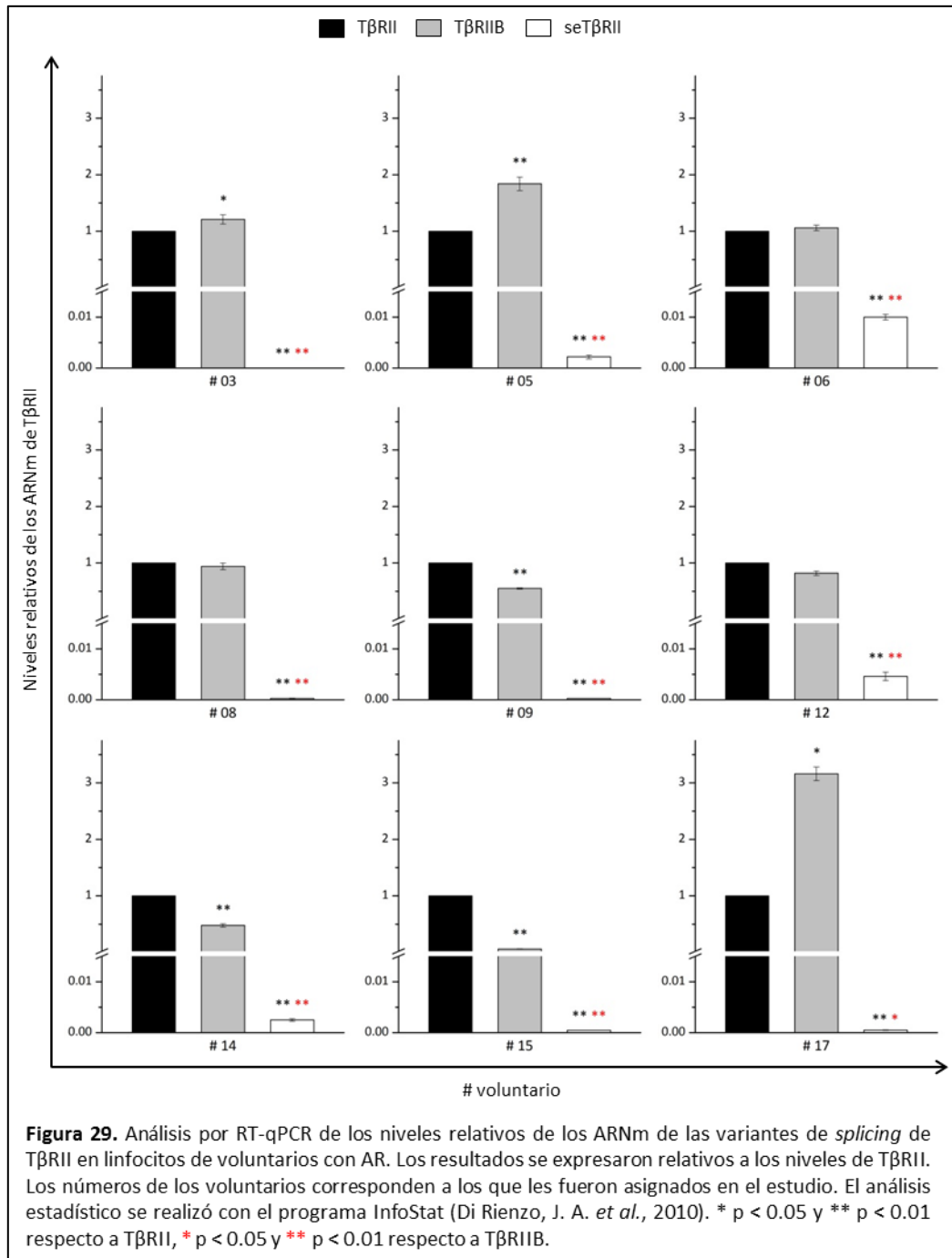
Debido a que en pacientes con artritis reumatoidea (AR) se ha demostrado que TGF- β ejerce un efecto singular sobre macrófagos, neutrófilos y linfocitos, nos propusimos averiguar si el patrón específico observado en los niveles de ARNm de las variantes de *splicing* de T β RII en algunos tipos celulares del sistema inmune, se mantenía en las mismas poblaciones leucocitarias de pacientes con AR.

El análisis cuantitativo de los ARNm de las distintas variantes de *splicing* de T β RII en granulocitos, linfocitos y monocitos de pacientes con AR no mostró un patrón reproducible en ninguna de las subpoblaciones leucocitarias analizadas.

En granulocitos de voluntarios con AR (Figura 28) pudo observarse que en todos los casos seT β RII es la variante minoritaria (disminuida entre 17 y 38 460 veces respecto a T β RII), excepto para un voluntario en el que no se observan diferencias entre los niveles de ARNm de ninguna de las tres variantes de T β RII. En cuatro de los nueve voluntarios la variante mayoritaria es T β RII, mientras que en los otros cuatro la variante mayoritaria es T β RIIB.

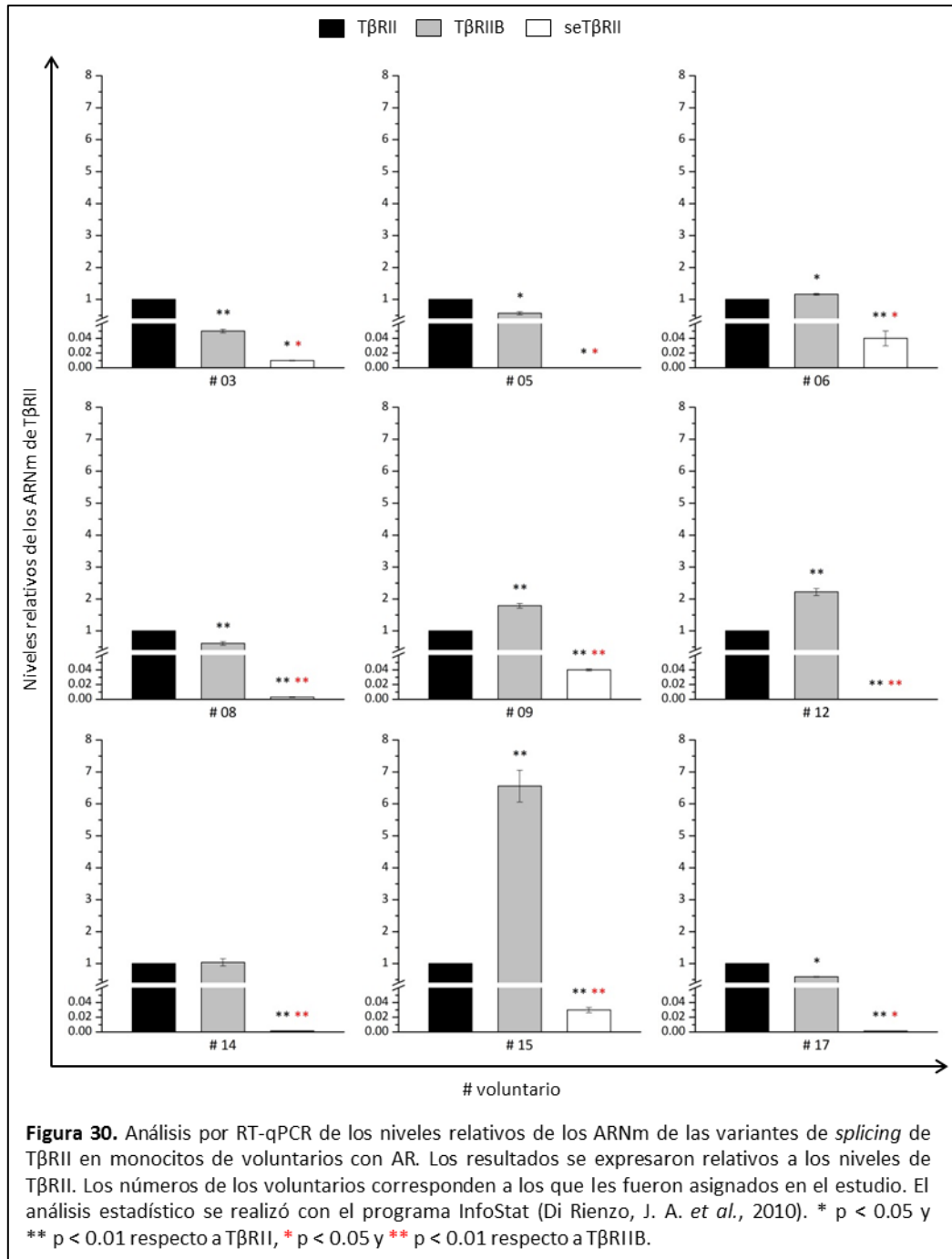


En el análisis realizado sobre linfocitos totales de voluntarios con AR (Figura 29) se observó que en tres de los nueve voluntarios T β RII es la variante predominante, en otros tres voluntarios la variante mayoritaria es T β RIIB, mientras que en los últimos tres voluntarios no hay diferencias significativas entre los niveles de ARNm de T β RII y de T β RIIB. Nuevamente, seT β RII constituye la variante menos abundante del receptor (disminuida entre 100 y 52 630 veces respecto a T β RII).



En monocitos de voluntarios con AR (Figura 30), en cuatro de las nueve muestras analizadas los niveles de ARNm de T β RII son mayoritarios, en otras cuatro muestras la variante

mayoritaria es T β RIIB, mientras que en una muestra los niveles de ARNm de T β RII y de T β RIIB fueron equivalentes. Con respecto a seT β RII, y al igual que lo observado en granulocitos y linfocitos, constituye la variante con menores niveles de expresión (disminuida entre 25 y 25 640 veces respecto a T β RII).



Estos resultados confirman que los patrones en los niveles de ARNm de las distintas variantes de *splicing* de T β RII observados en granulocitos y linfocitos de voluntarios sanos son específicos. Además, demuestran que dichos patrones se pierden en presencia de una enfermedad autoinmune como la AR. Esto sugiere que la vía de señalización de TGF- β ,

analizada en este caso a través de los niveles de ARNm de las distintas variantes de *splicing* del receptor tipo II, se encontraría desregulada en leucocitos de pacientes con AR.

3. Evaluación de correlaciones entre los niveles de ARNm de las distintas variantes de T β RII y las determinaciones clínicas de la AR

Con el propósito de evaluar la posibilidad de desarrollar un método que contribuya con parámetros objetivos al diagnóstico de AR, se correlacionaron los niveles relativos de ARNm de las distintas variantes de *splicing* de T β RII en granulocitos, linfocitos y monocitos de pacientes con AR con parámetros clínicos y bioquímicos de la enfermedad.

El estudio incluyó a los nueve voluntarios sanos (sin AR) y a los nueve voluntarios enfermos (con AR) mencionados anteriormente. Los criterios para la inclusión en el estudio fueron que los voluntarios estén dispuestos a otorgar consentimiento informado previo, que sean mayores de 18 años, para el grupo “sanos” que estén sanos y para los “enfermos” que reúnan los criterios ARA 1987 (Arnett, F. C. *et al.*, 1987). Los criterios de exclusión para ambos grupos fueron enfermedades y medicación concomitantes que pudieran generar sesgo en la interpretación de los resultados, tales como uso de drogas biológicas.

Se obtuvo información sobre: edad, sexo, tiempo de evolución de la enfermedad, enfermedades concomitantes, medicaciones para la AR, medicaciones concomitantes y se realizó eritrosedimentación (ESD). A los voluntarios enfermos se les determinó el número de articulaciones doloridas, número de articulaciones inflamadas, lesiones radiológicas y densidad mineral ósea de columna lumbar y cuello de fémur. Además de obtuvieron datos de DAS28 (por sus siglas en inglés, *Disease Activity Scores using 28 joint counts*), HAQ (por sus siglas en inglés, *Health Assessment Questionnaire*) y VAS (por sus siglas en inglés, *Visual Analogue Scale*).

Los datos y determinaciones clínicas y bioquímicas de los voluntarios se resumen en la Tabla 3.

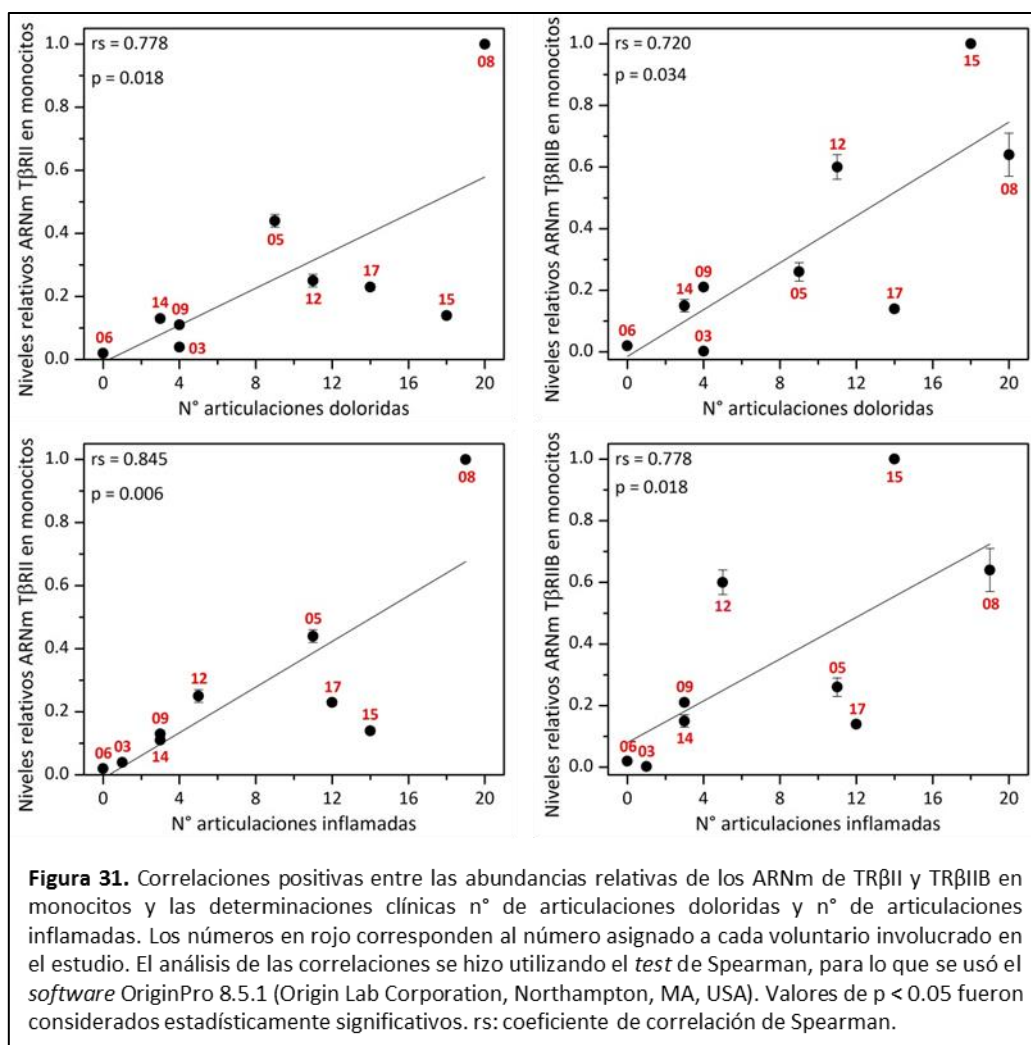
Características	AR (n=9)	VS (n=9)
<i>Demográficas</i>		
Edad, años	50.2 (23-78)	52.4 (22-75)
Sexo F/M	7/2	7/2
Duración de la enfermedad, años	11.58 (0.25-21)	ND
<i>Determinaciones clínicas</i>		
Número articulaciones doloridas	9.2 (0-20)	ND
Número articulaciones inflamadas	7.6 (0-19)	ND
DAS28	4.77 (2.58-6.65)	ND
HAQ	1.102 (0.125-2.800)	ND
VAS dolor paciente, mm	43.6 (20-72)	ND
VAS actividad paciente, mm	43.6 (29-78)	ND
VAS médico, mm	47 (5-80)	ND
<i>Parámetro analítico de laboratorio</i>		
ESD, mm	36.3 (9-65)	17.3 (4-35)
<i>Tratamiento con drogas</i>		
NSAID	5/9	ND
DMARD	6/9	ND

Tabla 3. Datos y determinaciones clínicas y bioquímicas de los voluntarios. Los valores corresponden a medias y, entre paréntesis, mínimos y máximos. VS: voluntarios sanos; F: femenino; M: masculino; ESD: eritrosedimentación; NSAID: por sus siglas en inglés, *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*; DMARD: por sus siglas en inglés, *Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs*; ND: no determinado.

Cuando fue necesario realizar comparaciones entre un voluntario sano y uno enfermo se aparearon voluntarios de igual sexo y edades similares, como se muestra en la Tabla 2.

Las correlaciones se realizaron utilizando *test* de Spearman, en el cual un coeficiente igual a 1 significa una correlación positiva perfecta, igual a -1 una correlación negativa perfecta e igual a 0 sin correlación.

De este modo, se pudo observar que en pacientes con AR los niveles de ARNm de T β RII y T β RIIB en monocitos se correlacionan positivamente, y de manera significativa, con el número de articulaciones doloridas y con el número de articulaciones inflamadas (Figura 31).

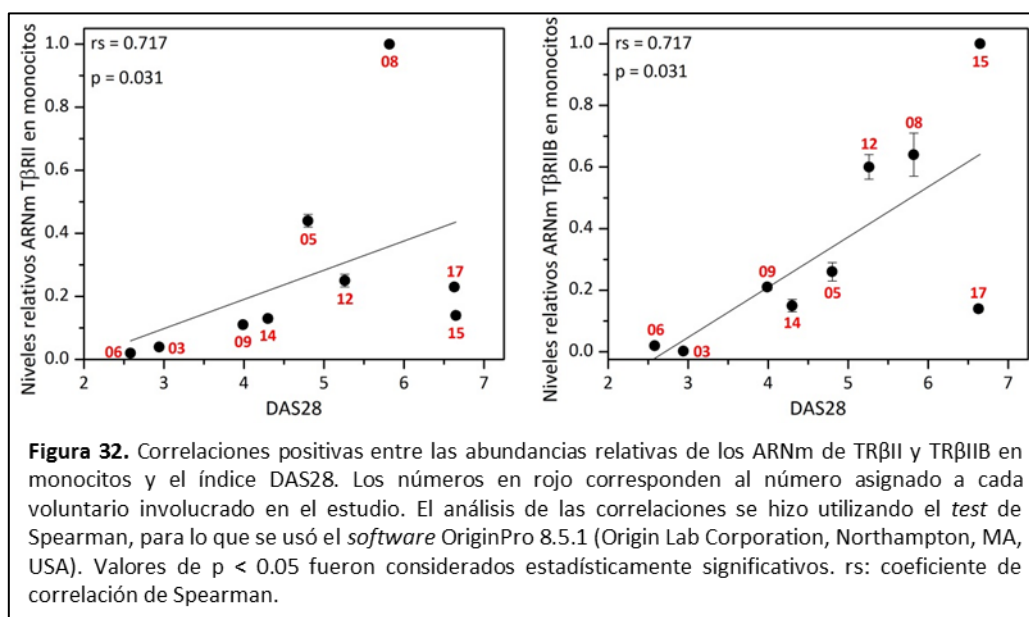


Como ya se ha mencionado, DAS28 es un índice que se emplea rutinariamente para determinar la actividad de la AR e incluye al número de articulaciones doloridas (NAD), al número de articulaciones inflamadas (NAI) —ambas determinadas sobre un total de 28 articulaciones definidas—, a la ESD y a la evaluación global de la enfermedad desde el punto de vista del paciente (EGP) que varía entre 0 (muy bien) y 10 cm (muy mal):

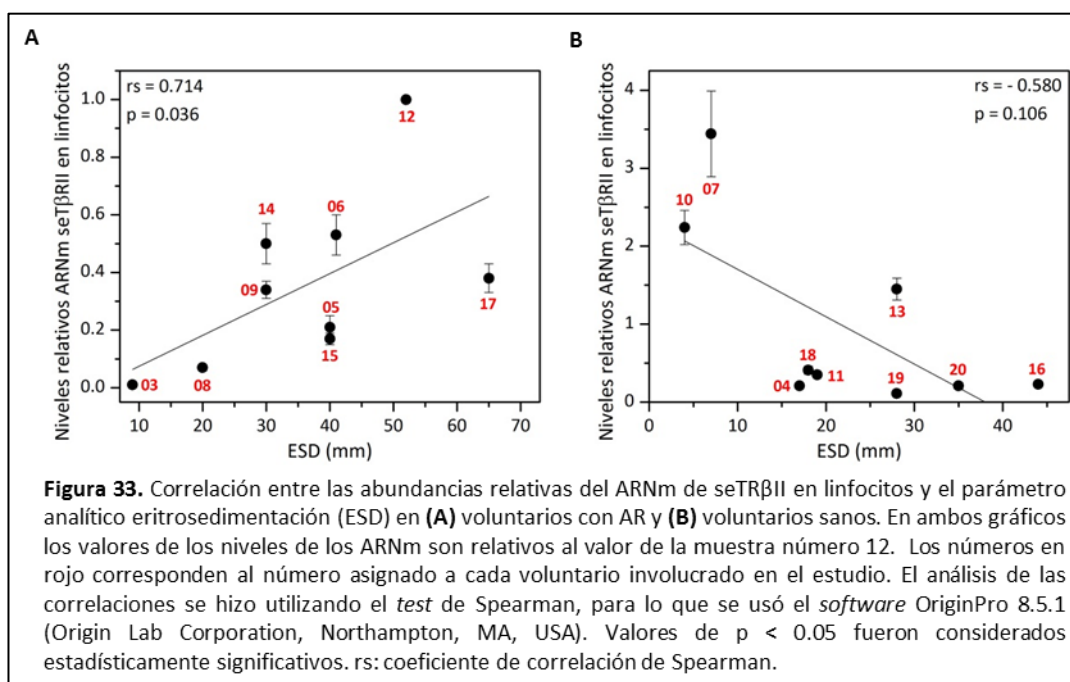
$$DAS28 = 0.56 \sqrt{NAD} + 0.28 \sqrt{NAI} + 0.70 (\ln ESD) + 0.014 (EGP)$$

Es de esperar que si las correlaciones entre los niveles de los ARNm de TRβII y TRβIIB en monocitos y el número de articulaciones doloridas e inflamadas son significativas, también lo sean aquellas entre los mismos ARNm y DAS28, ya que estas dos determinaciones clínicas están contenidas en la definición de DAS28. Es importante resaltar que si bien la ESD también está contenida en el índice DAS28, se trata de una variable inespecífica que puede verse afectada por otros factores además de la inflamación. Por esa razón, la ESD se utiliza generalmente en conjunto con otras determinaciones de la enfermedad. Por último, la EGP, que también está incluida en DAS28, es una variable subjetiva que depende de la evaluación que haga el paciente y, por lo tanto, no refleja de modo objetivo el estado de la enfermedad.

Como se esperaba, los valores de DAS28 se correlacionan positivamente con los niveles de ARNm de ambas variantes de *splicing* del receptor en monocitos (Figura 32).

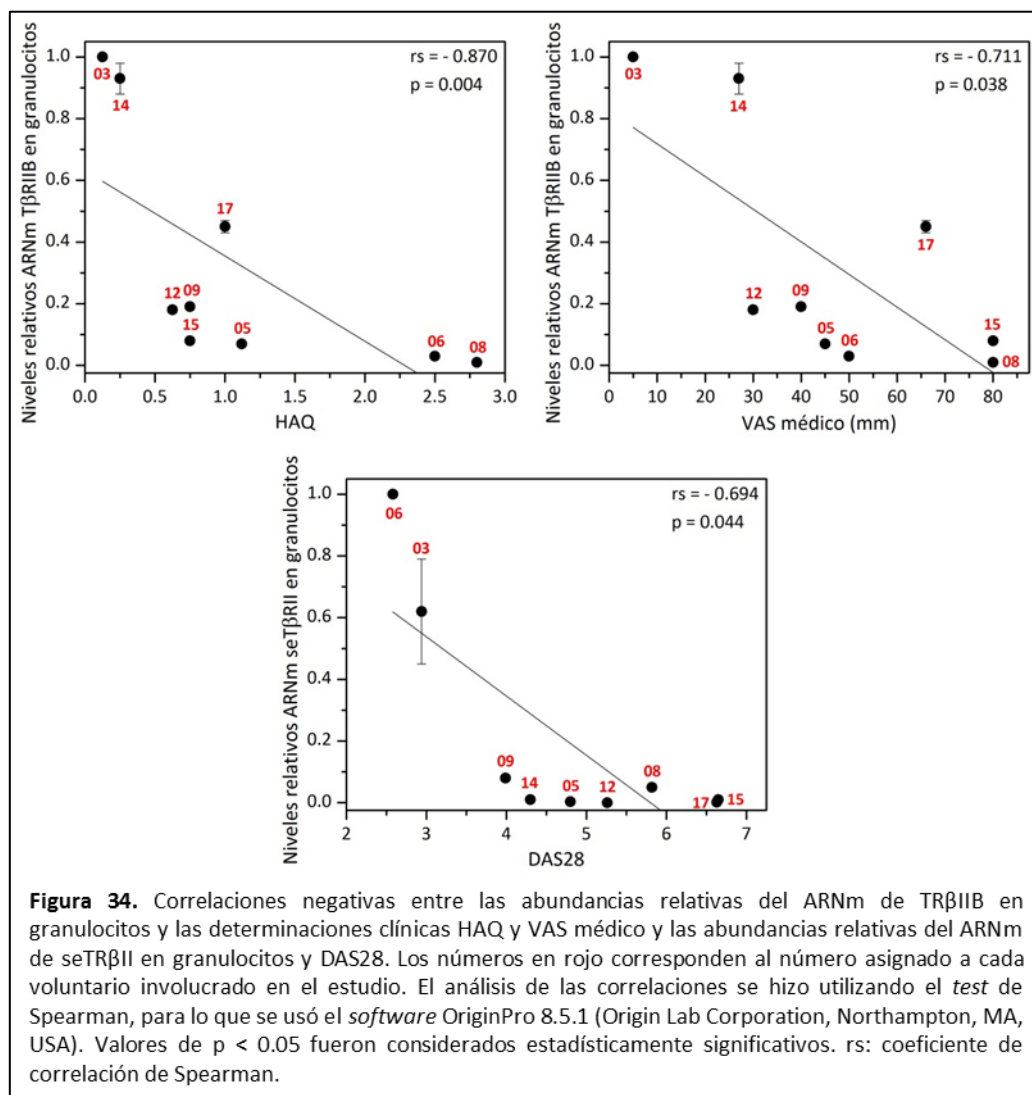


Por otro lado, se encontró una correlación positiva significativa entre los niveles de ARNm de seTRβII en linfocitos de pacientes con AR y los valores de ESD, que debería ser investigada en más detalle en estudios futuros. Es importante mencionar que la correlación entre estos dos parámetros para individuos sanos, a pesar de no ser estadísticamente significativa, es negativa (Figura 33).



Por otra parte, se encontraron correlaciones negativas entre los niveles de ARNm de TβRIIB en granulocitos y HAQ y VAS médico, y entre el ARNm de seTRβII en granulocitos y DAS28 (Figura

34). Si bien estas tres correlaciones son estadísticamente significativas, sólo pudo observarse un resultado congruente con el estado de la enfermedad cuando se examinaron los niveles de ARNm de seTβRII en granulocitos con DAS28. En ese caso, se encontró que sólo los dos pacientes con menor grado de la enfermedad (pacientes 03 y 06, ver Tabla 5) presentan niveles aumentados de seTβRII, con respecto al resto. En cuanto al análisis de los niveles de ARNm de TβRIIB en granulocitos en correlación con HAQ, si bien es estadísticamente significativo, si se toman como referencia los paciente con menor grado de la enfermedad se puede observar que el paciente 03 es el que muestra mayores niveles de TβRIIB y que el paciente 06 es el que muestra menores niveles de este ARNm, similares a los que se observan en pacientes con alto grado de evolución de la enfermedad (paciente 08). Resultados semejantes se obtuvieron en la correlación entre los niveles de ARNm de TβRIIB en granulocitos y VAS médico. Esto sugiere que las dos correlaciones que involucran el ARNm de TβRIIB en granulocitos no comprenden parámetros que podrían ser evaluados, al menos como parte del seguimiento del grado de evolución de la enfermedad.



Un resumen del análisis de correlaciones realizado se muestra en la Tabla 4. Como puede observarse, se obtuvo un total de siete correlaciones positivas y tres correlaciones negativas, estadísticamente significativas.

Variables correlacionadas	Coefficiente de Spearman (rs)	Valor de p
Número articulaciones inflamadas - ARNm TβRII en monocitos	0.845	0.006
Número articulaciones inflamadas - ARNm TβRIIB en monocitos	0.778	0.018
Número articulaciones doloridas - ARNm TβRII en monocitos	0.778	0.018
Número articulaciones doloridas - ARNm TβRIIB en monocitos	0.720	0.034
DAS 28 - ARNm TβRII en monocitos	0.717	0.031
DAS 28 - ARNm TβRIIB en monocitos	0.717	0.031
ESD - ARNm seTβRII en linfocitos	0.714	0.036
HAQ - ARNm TβRIIB en granulocitos	-0.870	0.004
VAS médico - ARNm TβRIIB en granulocitos	-0.711	0.038
DAS 28 - ARNm seTβRII en granulocitos	-0.694	0.044

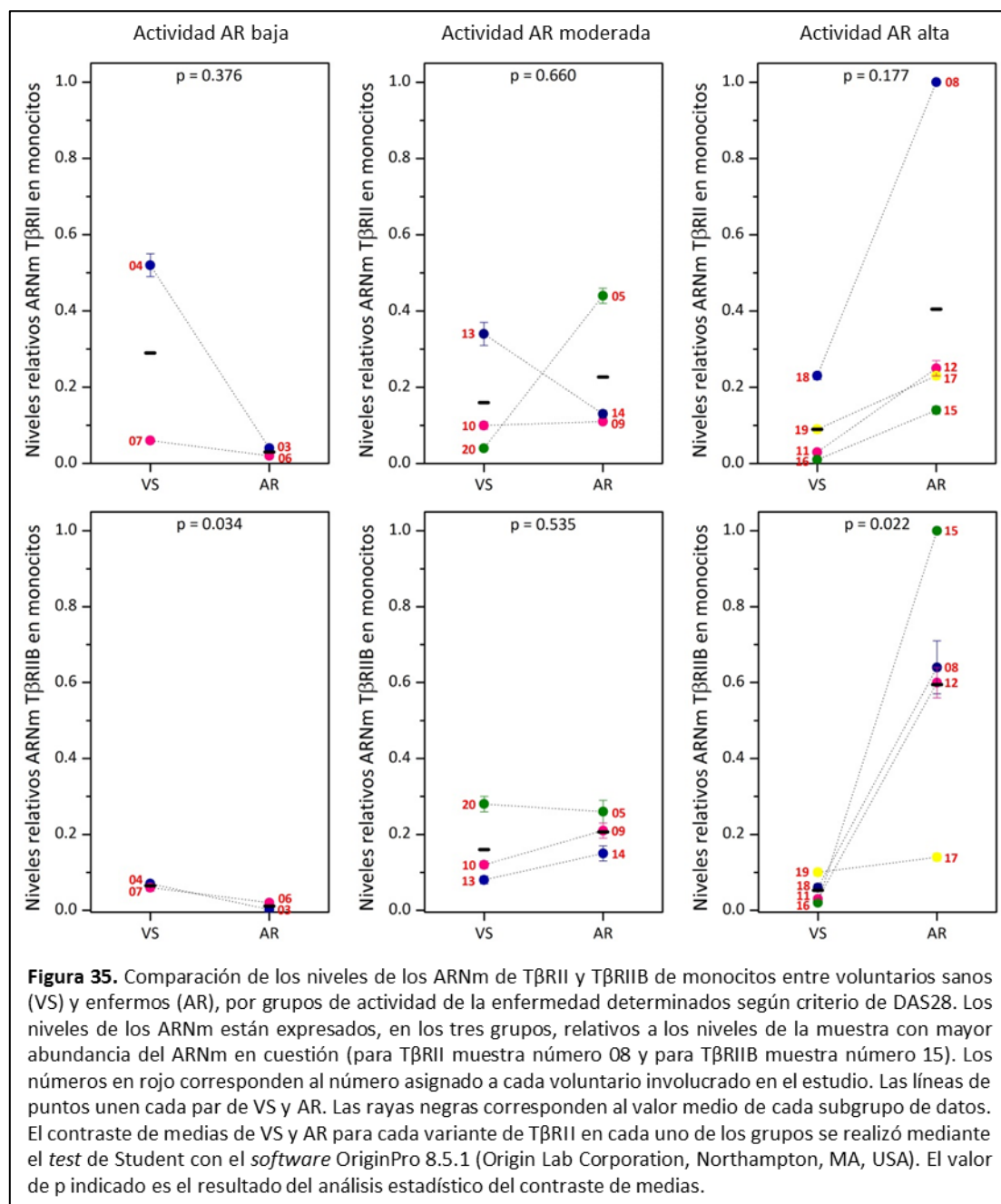
Tabla 4. Correlaciones estadísticamente significativas entre las distintas variables determinadas en los pacientes involucrados en el estudio. Las correlaciones se realizaron mediante el *test* de Spearman usando el *software* OriginPro 8.5.1 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA). Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Usando el índice DAS28 se pueden determinar tres grados de actividad de la enfermedad: baja (valores menores o iguales a 3.2), moderada (valores mayores a 3.2 y menores o iguales a 5.1) y alta (valores mayores a 5.1) (Tabla 5).

Actividad AR	Valor DAS28	N° paciente (valor DAS28)
Baja	≤ 3.2	06 (2.58)
		03 (2.94)
Moderada	$> 3.2 \text{ y } \leq 5.1$	09 (3.99)
		14 (4.30)
		05 (4.80)
		12 (5.26)
Alta	> 5.1	08 (5.82)
		17 (6.63)
		15 (6.65)

Tabla 5. Criterios de clasificación de la actividad de la AR según DAS28. Se incluyen los pacientes involucrados en el estudio en la categoría correspondiente de la AR según su valor de DAS28.

Cuando se analizaron en detalle las correlaciones significativas obtenidas se observó que de todos los ARNm estudiados sólo los niveles de ARNm de T β RII y T β RIIB en monocitos de pacientes con AR se distribuyen, con gran similitud, en los tres grupos en que se clasifica la enfermedad según DAS28. Los niveles de ARNm de T β RII y T β RIIB en monocitos de pacientes con AR aumentan conforme aumenta la actividad de la enfermedad. Para avanzar en la búsqueda de un nuevo candidato como biomarcador de AR se decidió, entonces, profundizar en el estudio de los ARNm de T β RII y T β RIIB en monocitos de pacientes con AR y de voluntarios sanos. Para ello, se graficaron los niveles relativos de los ARNm de T β RII y T β RIIB de monocitos de pacientes con AR, por grupos de actividad de la enfermedad, y se los comparó con los niveles de ARNm obtenidos en voluntarios sanos, apareados por sexo y edad (Figura 35).



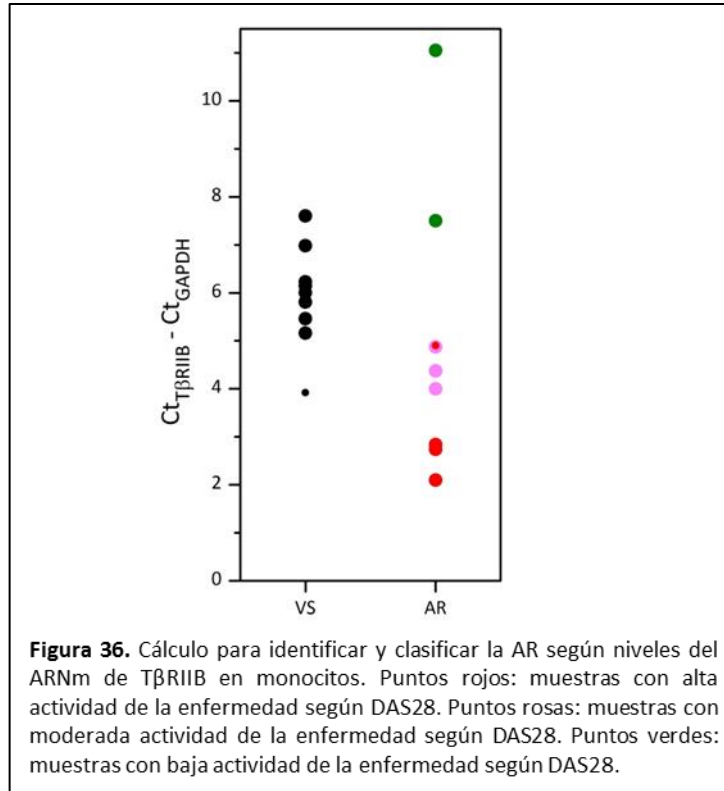
Para el grupo de muestras de actividad baja (03 y 06), los niveles de ARNm de T β RII y T β RIIB en monocitos están disminuidos respecto a los de sus respectivos ARNm en VS. Sin embargo, el análisis estadístico del contraste de medias entre VS y AR sólo da diferencia significativa para el ARNm de T β RIIB ($p < 0.05$).

Respecto al grupo de actividad moderada de la AR (muestras 05, 09, y 14), para los dos ARNm analizados en monocitos no se ve una tendencia definida en su variación, observándose tanto aumentos como disminuciones de ambos ARNm respecto a los ARNm correspondientes en VS. De hecho, en ambos casos, el análisis estadístico confirma que no hay diferencias significativas entre las medias contrastadas ($p > 0.05$).

Por último, en el grupo de muestras con alta actividad de la AR (08, 12, 15 y 17) se ve un aumento en los niveles de ARNm de las variantes T β RII y T β RIIB en monocitos, respecto a los niveles correspondientes en los VS. El análisis estadístico de este contraste de medias sólo arrojó diferencias significativas para la comparación del ARNm de T β RIIB entre VS y AR ($p < 0.05$).

Del análisis anterior se seleccionó, por lo tanto, el ARNm de T β RIIB en monocitos de pacientes con AR como candidato para ser evaluado como nuevo biomarcador de la enfermedad. Se pudo inferir que los niveles de ARNm de T β RIIB en monocitos de pacientes con AR aumentan conforme aumenta la actividad de la enfermedad y se distribuyen en tres grupos que concuerdan con las tres categorías de la enfermedad determinadas por los valores de DAS28. Si bien es necesario analizar un mayor número de pacientes para confirmar estos resultados, se podrían establecer valores de corte de los niveles de ARNm de T β RIIB en monocitos para emplear este parámetro como un biomarcador para el diagnóstico, determinación de actividad y pronóstico de la AR.

Una primera aproximación a utilizar como nuevo biomarcador de AR puede apreciarse en la Figura 36. Esta se basa en la utilización del parámetro Ct (por sus siglas en inglés, *cycle threshold*) obtenido por RT-qPCR para el gen analizado, en este caso T β RIIB. Cuanto más bajo es el valor de Ct obtenido, mayor abundancia del ARN del gen en cuestión. Para normalizar este valor se usa el Ct del gen constitutivo GAPDH. Por lo tanto, el cálculo que se usó para realizar esta aproximación es una diferencia de Ct, $\Delta Ct = Ct_{T\beta RIIB} - Ct_{GAPDH}$.



De este modo, se puede establecer un valor de corte en $\Delta Ct = 5$ por debajo del cual la persona sería positiva para este marcador de AR. Más aún, se podría diferenciar entre mayor y menor actividad de la enfermedad estableciendo otro corte en algún valor de ΔCt comprendido entre 3 y 4, el que se podrá determinar con más precisión cuando se analice un número mayor de muestras.

El cálculo propuesto podría ser, en un futuro, un nuevo *test* diagnóstico para AR. Como para todo *test* de este tipo se deben estimar, previamente, las siguientes cantidades que sirven para probar su eficacia (Daniel, W. W., 2005):

Sensibilidad, $P[T^+|E]$: probabilidad de que el *test* de positivo en una persona que se sabe padece la enfermedad. En el caso de nuestro *test*, $P[T^+|E] = 7/9 = 0.78$

Especificidad, $P[T^-|\bar{E}]$: probabilidad de que el *test* de negativo en una persona que no padece la enfermedad. En el caso de nuestro *test*, $P[T^-|\bar{E}] = 8/9 = 0.89$

Donde se usó la siguiente notación:

$E \equiv$ padece la enfermedad;

$\bar{E} \equiv$ no padece la enfermedad;

$T^+ \equiv$ el resultado del *test* es positivo;

$T^- \equiv$ el resultado del *test* es negativo.

Es importante mencionar que el único falso positivo que arroja el *test* diagnóstico propuesto corresponde al voluntario número 20, representado por el círculo negro más pequeño en la Figura 36. Este individuo padece de osteoartritis, condición que podría explicar tal comportamiento.

Teniendo en cuenta lo anterior, se podría eliminar al VS número 20 de nuestro análisis y recalculer la especificidad del *test* diagnóstico propuesto. De este modo, $P[T^-|\bar{E}] = 8/8 = 1$

Con los datos calculados de sensibilidad y especificidad y con el dato epidemiológico de la prevalencia de la enfermedad, $P[E]$, que para la AR es 0.002, se utiliza el teorema de Bayes (Daniel, W. W., 2005) para calcular:

Índice predictivo de verdaderos positivos, $P[E|T^+]$: probabilidad de que una persona esté realmente enferma si el *test* le dio positivo. En nuestro caso,

$$P[E|T^+] = \frac{P[T^+|E] \times P[E]}{P[T^+|E] \times P[E] + (1 - P[T^-|E]) \times (1 - P[E])} = \frac{0.78 \times 0.002}{0.78 \times 0.002 + (1 - 1) \times 0.998} = 1$$

Índice predictivo de verdaderos negativos, $P[\bar{E}|T^-]$: probabilidad de que una persona esté realmente sana si el *test* le dio negativo. En nuestro caso,

$$P[\bar{E}|T^-] = \frac{P[T^-|\bar{E}] \times (1 - P[E])}{P[T^-|\bar{E}] \times (1 - P[E]) + (1 - P[T^+|E]) \times P[E]} = \frac{1 \times 0.998}{1 \times 0.998 + (1 - 0.78) \times 0.002} = 0.99$$

Estos índices son de suma utilidad para el médico clínico que desea evaluar la probabilidad de que un individuo esté o no enfermo en función de los resultados de las pruebas que se realizan sobre el mismo.

Nuestro análisis muestra, aunque en un número bajo de pacientes, la potencialidad del uso de los niveles de ARNm de T β RIIB de monocitos como un posible biomarcador para evaluar el estado de la enfermedad en pacientes con AR.

Discusión

En esta tesis se estudiaron las variantes de *splicing* del receptor tipo II de TGF- β en células humanas. Por un lado, se caracterizó una nueva variante del receptor y se analizó su presencia, a nivel de ARNm y proteína, en distintos tipos celulares. Por otro, se estudió en detalle la abundancia de los ARNm de las distintas variantes de T β RII en líneas celulares y cultivos primarios humanos y en poblaciones leucocitarias humanas. El análisis adicional de las abundancias de estos ARNm en poblaciones leucocitarias de pacientes con artritis reumatoidea (AR) permitió vincular esta enfermedad con la vía de señalización de TGF- β y encontrar posibles nuevos biomarcadores de AR.

De gran relevancia es el hallazgo de una nueva variante de *splicing* de T β RII en distintos tipos de células humanas. El ARNm de esta nueva variante se detectó en todos los tipos celulares analizados, aunque siempre en niveles más bajos que los de las otras dos variantes conocidas del receptor. El análisis *in silico* de su secuencia de aminoácidos reveló un corrimiento del marco de lectura que produce un receptor más pequeño debido a la aparición prematura de un codón de terminación de la traducción. De este modo, la nueva variante del receptor de TGF- β carece de los dominios intracitoplasmático y transmembrana, motivo por el cual se trataría de la primera descripción de un receptor tipo II de TGF- β humano que se secretaría al medio extracelular. La existencia de una variante de *splicing* de T β RI en ratas, que presenta una inserción de cinco aminoácidos seguida de un codón de terminación y que carece de los dominios transmembrana y citoplasmático, ha sido descrita previamente (Choi, M. E., 1999). Su secuencia de aminoácidos predijo que se trataría de una forma secretable de T β RI por lo que se la denominó sT β RI. En ese trabajo se demostró la expresión del ARNm de sT β RI tanto en riñones de ratas recién nacidas como adultas. Sin embargo, la abundancia de este ARNm fue mucho mayor en riñones neonatos, lo que hizo pensar en un posible rol de sT β RI en el desarrollo renal. Además, se puso en evidencia que sT β RI es una proteína funcional capaz de unir a TGF- β 1 en presencia de T β RII y que podría funcionar como un potenciador de la citoquina. También ha sido descrita en la literatura la forma soluble de T β RIII. Andres, J. L. *et al.* (1989) demostraron que varios tipos celulares pueden liberar al medio de cultivo una forma soluble de T β RIII, que también se puede encontrar en suero y en matrices extracelulares. Más tarde, se detectó la presencia de sT β RIII en leche de rata. Esta forma soluble de T β RIII podría unirse y modular la acción del TGF- β derivado de leche, en el intestino en desarrollo (Zhang, M. F. *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta estos antecedentes, no sería desatinado pensar que T β RII también podría presentar una forma soluble. En los estudios por *western blot* realizados en nuestro trabajo, la proteína correspondiente a la nueva variante de *splicing* de T β RII sólo se pudo detectar en sobrenadantes de células modificadas genéticamente que la sobreexpresan y que se crecieron en presencia de inhibidores de proteasas. Esto era de esperar ya que se sabe que la concentración de receptores solubles endógenos es, generalmente, muy baja. Por lo tanto, su purificación a partir de fluidos corporales no provee de cantidades considerables necesarias para el estudio de las interacciones receptor-ligando. Por este motivo, se han

desarrollado distintas estrategias a fin de aumentar los niveles de receptores solubles endógenos (Rose-John, S. *et al.*, 1994). Entre ellas, una de las más empleadas, es su expresión como proteínas de fusión con la región Fc de la inmunoglobulina humana IgG1. Se sabe que la presencia del dominio Fc incrementa marcadamente la vida media de una proteína de fusión en el plasma y que, además, aumenta su afinidad por el ligando debido a su naturaleza dimérica, comparada con la de los receptores nativos monoméricos (Fernandez-Botran, R., 2000). Sin embargo, a pesar de que se cree que los receptores solubles recombinantes presentan propiedades idénticas a las de los receptores solubles que se encuentran naturalmente, esto no siempre es así. Incluso, en algunos casos la proteína correspondiente al receptor soluble natural nunca se ha detectado (Rose-John, S. *et al.*, 1994). Por tratarse la nueva isoforma de T β RII de una proteína secretable y de producción endógena por las células la denominamos seT β RII. Se utilizó esta nomenclatura para diferenciarla de la variante soluble de T β RII (sT β RII-Fc) generada por ingeniería genética, que consiste en el dominio extracelular del receptor T β RII fusionado a la región Fc de la inmunoglobulina humana IgG1 (Komesli, S. *et al.*, 1998; Smith, J. D. *et al.*, 1999) y que ha sido ampliamente utilizada en estudios preclínicos y clínicos como un antagonista de TGF- β (Isaka, Y. *et al.*, 1999; Muraoka, R. S. *et al.*, 2002; Yang, Y. *et al.*, 2002; Suzuki, E. *et al.*, 2004).

El análisis *in silico* de la secuencia de la proteína seT β RII indicó, también, que la nueva isoforma del receptor perdería aminoácidos fundamentales para que ocurra la unión productiva con TGF- β 1 y TGF- β 3. La determinación de la estructura cristalina de complejos entre el dominio extracelular de T β RII y TGF- β 3 humanos permitió establecer que el plegamiento de T β RII es compacto y consiste en nueve cadenas β y una α -hélice simple, estabilizado por una red de seis puentes disulfuro intracatenarios (C51-C84, C54-71, C61-67, C77-C101, C121-C136 y C138-C143). Además, en la interfaz con TGF- β 3, T β RII presenta once residuos (L50, F53, D55, S72, I73, T74, S75, I76, E78, D141 y E142) (Hart, P. J. *et al.*, 2002). Se ha demostrado que E142 y D55 forman puentes de hidrógeno altamente específicos con los residuos clave del ligando, R25 y R94, respectivamente. Estos son los únicos dos pares de puentes de hidrógeno en la interfaz de la unión, lo que sugiere que jugarían un rol crítico en la determinación de la especificidad de la unión receptor-ligando. El aminoácido I76 es otro residuo fundamental del receptor en la interfaz hidrofóbica que hace contacto con V92 y W32 de TGF- β 3 (Baardsnes, J. *et al.*, 2009; Radaev, S. *et al.*, 2010). Respecto a la contribución que realizan los puentes disulfuro de T β RII a la interacción con el ligando, mediante modelado de la estructura del ectodominio de T β RII se encontró que el puente disulfuro C54-C71 está expuesto al solvente y podría interactuar directamente con el ligando. Además, a través de ensayos de unión a TGF- β 1 y de señalización, se demostró que el residuo C71 es necesario para que ocurran ambos eventos (Guimond, A. *et al.*, 2002). Por otro lado, la conformación de la estructura secundaria de la región de T β RII que contacta con TGF- β 1 se encuentra estabilizada por el puente disulfuro C61-C67 (Radaev, S. *et al.*, 2010). En la nueva isoforma hallada de T β RII los residuos C71, I76 y E142 están ausentes

por lo que si fuera capaz de unirse a TGF- β 1 o TGF- β 3 lo haría con una afinidad muy baja, comparada con la de T β RII, o interactuaría con su/s ligando/s a través de otros aminoácidos. Existen evidencias de uniones diferenciales entre las formas unida a membrana o soluble de un mismo receptor a un determinado ligando. Se ha visto que el receptor tipo II de IL-1 (IL-1RII) une a dos de sus ligandos, la forma biológicamente inactiva de IL-1 β (pro-IL-1 β) y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra), con afinidades diferentes según se encuentre unido a membrana o en su forma soluble. La afinidad de IL-1RII por IL-1ra disminuye 2000 veces en la forma soluble del receptor, mientras que sólo la forma soluble es capaz de unir a pro-IL-1 β (Symons, J. A. *et al.*, 1995).

La generación de receptores solubles no es un proceso estocástico y puede estar regulada de manera diferencial a la expresión del receptor unido a membrana. Existen distintos mecanismos de acción de los receptores solubles. Uno de ellos consiste en la regulación negativa del receptor unido a membrana que limita la respuesta celular al ligando. Esto se consigue mediante el corte proteolítico del receptor unido a membrana para generar su versión soluble. En otro mecanismo, el receptor soluble es una proteína de unión que protege al ligando de la degradación o eliminación del espacio extracelular. En este modelo el receptor soluble no está involucrado directamente en la señalización del ligando, sino que facilita la entrega del mismo al receptor unido a membrana en la célula blanco. Otra posibilidad es que el receptor soluble funcione como un antagonista al competir directamente con el receptor unido a membrana por el ligando. Por último, el receptor soluble puede actuar como un agonista al facilitar la señalización a través del ligando y, de esta manera, sensibilizar células que no expresan el receptor unido a membrana (Heaney, M. L. *et al.*, 1996). En este complejo escenario, es de esperar que el efecto neto de un receptor soluble sobre la actividad de una citoquina *in vivo* esté definido por el balance entre sus efectos como antagonista y como agonista. Es probable que este balance esté, a su vez, influenciado por las concentraciones locales de ligando y de receptor soluble y por el número y la afinidad de los receptores unidos a membrana presentes en la célula blanco (Fernandez-Botran, R., 2000). Por todo esto y debido a que se sabe que existen receptores solubles endógenos que funcionan naturalmente como antagonistas o agonistas de las citoquinas a las que se unen (Levine, S. J., 2004), por ejemplo, el receptor soluble tipo II de IL1 (sIL-1RII) es un antagonista de IL-1 (Giri, J. G. *et al.*, 1994) mientras que el receptor soluble de IL-6 (sIL-6R) funciona como agonista de IL-6 (Novick, D. *et al.*, 1992; Peters, M. S. *et al.*, 1996), se decidió analizar la posibilidad de que seT β RII sea un antagonista o un agonista de TGF- β . Para ello, teniendo en cuenta que TGF- β 1 regula negativamente la progresión del ciclo celular en varios tipos celulares (Anzano, M. A. *et al.*, 1986; Fräter-Schröder, M. *et al.*, 1986; Kehrl, J. H. *et al.*, 1986), entre ellos el de células de adenocarcinoma de pulmón A549 (Roberts, A. B. *et al.*, 1985), se evaluó la capacidad de seT β RII de revertir o de potenciar la inhibición de la proliferación celular producida por

TGF- β 1, y por analogía por TGF- β 3 (Wrana, J. L. *et al.*, 1992), o por TGF- β 2 en células A549 que sobreexpresan la nueva variante de T β RII.

En el ensayo realizado con TGF- β 1 se pudo observar que en células que sobreexpresan seT β RII la inhibición de la proliferación celular comienza a concentraciones más bajas de citoquina que en células sin transducir. Este resultado hizo pensar en una posible función agonista de seT β RII. Para confirmar que seT β RII funciona como un agonista de TGF- β 1, se decidió evaluar si la nueva isoforma soluble de T β RII es capaz de potenciar los efectos que TGF- β 1 ejerce sobre la expresión de otras citoquinas. Distintos estudios han demostrado que este factor de crecimiento aumenta los niveles de ARNm de IL-6, por ejemplo, en astrocitos (Benveniste, E. N. *et al.*, 1994) y en células epiteliales de timo humano (Schluns, K. S. *et al.*, 1997) y tanto los niveles de ARNm como los de proteína de IL-6 en mioblastos humanos (Mazzarelli, P. *et al.*, 1998) y en cultivos primarios de fibroblastos de pulmón humano (Eickelberg, O. *et al.*, 1999). En cuanto a la regulación negativa ejercida por TGF- β 1 se ha demostrado que, en determinadas situaciones, disminuye los niveles de ARNm y de proteína de GM-CSF. Por ejemplo, se encontró que luego de la infección de una línea celular de osteosarcoma con citomegalovirus humano se produce un aumento en la producción de TGF- β 1 seguido de una consecuente disminución en la expresión de GM-CSF (Kwon, Y. J. *et al.*, 2004). Otro ejemplo se observó en macrófagos que ingirieron células apoptóticas, los cuales mostraron un aumento en los niveles de TGF- β 1, que a su vez produjo una disminución en los niveles de proteína de GM-CSF (Fadok, V. A. *et al.*, 1998). Los resultados de nuestro trabajo con células que sobreexpresan seT β RII mostraron potenciación de los efectos de TGF- β 1 sobre la regulación de los niveles de ARNm de IL-6 y de GM-CSF. Esto, sumado a la sensibilidad aumentada a TGF- β 1 por parte de células que sobreexpresan seT β RII en el ensayo de proliferación celular, permitió asignarle a la nueva isoforma de T β RII la función de agonista de TGF- β 1. Consistentes con estos resultados son los obtenidos por Rodríguez, T. M. *et al.* (resultados no publicados de nuestro laboratorio) que muestran que en células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano que sobreexpresan seT β RII también se observa un aumento en los niveles de ARNm de IL-6 y una disminución en los de GM-CSF, respecto a los de células transducidas con el vector Lt-EGFP. Los mecanismos a través de los cuales un receptor soluble podría llevar a cabo su función como agonista incluyen (1) aumento de la estabilidad de la citoquina, (2) protección de la citoquina contra la proteólisis, (3) transferencia de la citoquina a receptores de membrana, (4) modificación de propiedades farmacocinéticas como aumento de la vida media o disminución de su velocidad de eliminación y (5) interacción con subunidades transductoras de señales. Es importante resaltar que la capacidad de un receptor soluble de actuar como agonista de sus ligandos se podría aprovechar para aumentar la actividad de citoquinas administradas de manera exógena con fines terapéuticos. Para alcanzar concentraciones farmacológicas de citoquinas en circulación es necesaria la administración de altas concentraciones debido a su corta vida media, lo que trae aparejados efectos secundarios

indeseables. El empleo de receptores solubles como adyuvantes en las inmunoterapias con citoquinas permitiría usar dosis más bajas de citoquinas, lo que disminuiría sus efectos secundarios tóxicos (Fernandez-Botran, R., 2000).

Respecto al ensayo de proliferación celular realizado con células que sobreexpresan seTβRII en presencia de TGF-β2, en el cual el receptor no se comportó como agonista ni como antagonista de la citoquina, resulta de interés resaltar que la gran dispersión de los datos podría explicar que el análisis estadístico no arroje diferencias significativas entre la proliferación de las células en ausencia y en presencia de la citoquina. De hecho, el análisis estadístico por ANOVA de una vía concluye que las medias de las poblaciones son significativamente diferentes ($p = 0.035$), pero el posterior contraste de medias por el *test* de Tukey no encuentra diferencias significativas entre las células que sobreexpresan seTβRII en ausencia o presencia de cada una de las concentraciones de TGF-β2 ensayadas. Más aún, si luego del análisis por ANOVA se usa el *test* de Fisher para contrastar las medias, un *test* definido como más liberal que el de Tukey, sí se observan las diferencias significativas esperadas en la inhibición de la proliferación celular a partir de 0.2 nM de TGF-β2, comparada con las mismas células en ausencia de citoquina exógena, que se mantiene hasta la última concentración de citoquina ensayada (0.4 nM). El resultado de este análisis refuerza el hecho de que seTβRII no funciona como un antagonista de TGF-β2 al mostrar un comportamiento, en lo que respecta a la sensibilidad a la citoquina, similar al de las células sin transducir o transducidas con Lt-EGFP.

Otro resultado importante obtenido en el ensayo de proliferación celular fue el efecto potenciador, por parte del vector lentiviral, sobre la inhibición de la proliferación celular ejercida por TGF-β1. Esto se puso en evidencia en los resultados obtenidos con el vector control Lt-EGFP. Este efecto no se observó sobre la inhibición de la proliferación celular ejercida por TGF-β2. Este resultado podría ser atribuido a que la modificación celular con el vector lentiviral aumenta los niveles endógenos de TGF-β1 pero no los de TGF-β2. Distintas observaciones sustentan esta hipótesis ya que se ha comprobado que tanto en pacientes infectados con HIV como en cultivos celulares infectados *in vitro* con este virus, del cual derivan los vectores lentivirales usados en este trabajo, los niveles de TGF-β1 pero no los de TGF-β2 están aumentados, comparados con los de individuos sanos o los de células sin infectar (Kekow, J. *et al.*, 1990; Allen, J. B. *et al.*, 1991; Pal, S. *et al.*, 2004). Por otro lado, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano transducidas con Lt-EGFP y con una pureza del 90 %, conseguida por separación celular, presentan niveles aumentados del ARNm de TβRII de hasta cuatro veces, pero no presentan modificaciones en los niveles de ARNm de TβRIIB, comparados con los niveles de células sin transducir (Rodríguez, T. M. *et al.*, resultados no publicados). Debido a que TGF-β1 señala principalmente a través de su unión a TβRII (Wrana, J. L. *et al.*, 1994b) y a que como TGF-β2 tiene una afinidad muy baja por esta isoforma del receptor (Lin, H. Y. *et al.*, 1995; Baardsnes, J. *et al.*, 2009) emplea otra vías de señalización a

través de T β RIII (López-Casillas, F. *et al.*, 1993) o de T β RIIB (del Re, E. *et al.*, 2004), esta regulación de los niveles de ARNm de los receptores de TGF- β producida por el vector lentiviral podría explicar la mayor sensibilidad que presentan las células a TGF- β 1 y no a TGF- β 2. Sin embargo, en la línea celular A549, usada en este trabajo para realizar el ensayo de proliferación celular, transducida con el vector control Lt-EGFP no pudieron observarse cambios contundentes en los niveles de ARNm de ninguna de las variantes de T β RII (Figura 15). Esta diferencia con las células mesenquimales humanas podría deberse a que no se trabajó con células A549 de alta pureza, sino con una población celular que expresa el transgén en un porcentaje restringido (46-65 %).

Diversos estudios han demostrado que la expresión de un receptor tipo II de TGF- β truncado, carente del dominio serina/treonina quinasa citoplasmático, funciona como un mutante dominante negativo que inhibe los efectos de la citoquina (Brand, T. *et al.*, 1993; Chen, R. -H. *et al.*, 1993; Weiser, R. *et al.*, 1993; Yamamoto, H. *et al.*, 1996; Fan, X. *et al.*, 2002). El primero de estos estudios mostró que el receptor truncado es capaz de bloquear la señalización a través de las tres isoformas de TGF- β en cardiomiocitos de rata (Brand, T. *et al.*, 1993). Chen, R. -H. *et al.* (1993) demostraron que el receptor truncado se encuentra expuesto en la superficie celular y mantiene su capacidad de unirse a TGF- β . Además, confirmaron que la sobreexpresión de este mutante inhibe específicamente la función de los receptores tipo II de TGF- β endógenos y anula las respuestas celulares a la citoquina. En un estudio posterior de los mismos autores se mostró que los receptores tipo II de TGF- β , tanto salvajes como truncados, pueden formar complejos homoméricos aún en ausencia del ligando. Estos complejos preexistentes son capaces de unirse a TGF- β . También demostraron la existencia simultánea de complejos homodiméricos tipo II y hetediméricos tipo I-tipo II *in vivo* en células que expresan ambos receptores (Chen, R. -H. *et al.*, 1994). Los resultados obtenidos en esta tesis en el ensayo de proliferación celular realizado con células que sobreexpresan el mutante T β RIIDN confirmaron que, en presencia de TGF- β 1, este receptor funciona como un dominante negativo que antagoniza los efectos de la citoquina. Debido a que las afinidades de TGF- β 1 y TGF- β 3 por T β RII son similares (Wrana, J. L. *et al.*, 1992; De Crescenzo, G. *et al.*, 2006; Baardsnes, J. *et al.*, 2009), se podría extrapolar el resultado obtenido con TGF- β 1 a TGF- β 3, ya que también se ha visto que T β RIIDN funciona como un antagonista de esta isoforma de TGF- β (Brand, T. *et al.*, 1993). Por el contrario, en el ensayo realizado con células que sobreexpresan T β RIIDN en presencia de TGF- β 2 se observó que, a partir de una concentración de 0.1 nM de la citoquina, la proliferación celular comienza a disminuir. Este resultado indica que el mutante, en este caso, no se comportaría como un dominante negativo.

El estudio de la variante de *splicing* T β RIIB permitió detectar su ARNm en células sanguíneas humanas (granulocitos, monocitos, linfocitos T y linfocitos B), en células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano y en líneas celulares humanas derivadas tanto de tejidos

normales como tumorales. Estos resultados acrecientan la abundante distribución del ARNm de esta variante del receptor, encontrado previamente en células humanas relacionadas con la función ósea como osteoblastos fetales y células de osteosarcoma, en la línea derivada de carcinoma hepatocelular humano, Hep 3B, en la línea derivada de neuroblastoma humano, IMR 32 (Rotzer, D. et al., 2001) y en distintas líneas celulares prostáticas humanas (Konrad, L. et al., 2007).

Si bien se conoce la forma de acción del mutante T β RIIDN, hasta el momento no hay datos en la literatura que describan si la eliminación del dominio intracitoplasmático de T β RIIB produce efectos similares. Por lo tanto, se sobreexpresó el receptor truncado T β RIIB Δ c en la línea celular A549 para evaluar su efecto sobre la proliferación celular en presencia de distintas concentraciones de TGF- β 1 o TGF- β 2. Los resultados obtenidos en este ensayo demostraron que el nuevo receptor truncado de T β RIIB, incapaz de completar la vía de señalización de TGF- β debido a que carece de la región intracelular del receptor, se comporta como un antagonista tanto de TGF- β 1 como de TGF- β 2. Este efecto se observó a pesar de haber trabajado con una población celular donde sólo el 20 % expresaba el transgén. Esto sugiere que TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, esta última por analogía en su modo de acción con el de TGF- β 1 (Wrana, J. L. et al., 1992; De Crescenzo, G. et al., 2006; Baardsnes, J. et al., 2009), son capaces de unirse a T β RIIB, lo que concuerda con lo descrito en estudios previos (Rotzer, D. et al., 2001; del Re, E. et al. 2004). El hecho de que T β RIIB Δ c presente mejores propiedades antagonistas de TGF- β que T β RIIDN, debido a sus mayores efectos como receptor dominante negativo de TGF- β 2, representaría una ventaja sobre T β RIIDN en su uso con fines terapéuticos como un neutralizante de las tres isoformas de TGF- β , cuando ese fuera el objetivo de la terapia. En este sentido, en un estudio reciente se diseñaron dos “trampas” contra TGF- β que consisten en receptores bivalentes de cadenas simples cuyas ventajas residen en que son hasta tres veces más pequeños que los anticuerpos usados con el mismo fin, lo que les permitiría penetrar mejor en los tejidos blanco, y en que están compuestos completamente por secuencias de los receptores nativos (una “trampa” hecha a partir de la secuencia de T β RII y la otra a partir de la de T β RIIB), lo que disminuiría su inmunogenicidad (Zwaagstra, J. C. et al., 2012). Estas “trampas” mostraron una capacidad para neutralizar a TGF- β 1 y a TGF- β 3 comparable a la del anticuerpo 1D11, diseñado para ese fin. Sin embargo, a diferencia del anticuerpo 1D11, no fueron capaces de neutralizar a TGF- β 2. El nuevo mutante generado en esta tesis, T β RIIB Δ c, además de compartir con estas “trampas” la ventaja de no presentar secuencias extra a las de los receptores nativos, mostró su capacidad de antagonizar los efectos de TGF- β 2 por lo que se esperaría que fuera un candidato atractivo para ser usado en aplicaciones terapéuticas en las que se busque bloquear los efectos de TGF- β . El hecho de que T β RIIB Δ c sea capaz de neutralizar a TGF- β 2, mientras que la “trampa” generada en base a T β RIIB no lo sea, podría deberse a la corta vida media que posee la “trampa”. Esto podría explicar la rápida velocidad de disociación entre la “trampa” y TGF- β 2 y la disminución de la

potencia de esta unión (Zwaagstra, J. C. *et al.*, 2012). Al ser T β RIIB Δ c un receptor que permanece unido a membrana, ya que conserva el dominio transmembrana del receptor salvaje, no presentaría grandes restricciones de acción debidas a su vida media lo que, consecuentemente, mejoraría su capacidad de unir y neutralizar a TGF- β 2.

La presencia de receptores solubles en fluidos biológicos podría ser parte de un mecanismo general regulatorio de la actividad de mediadores solubles *in vivo*. Probablemente, condiciones que afecten al sistema inmune y conduzcan a la activación, proliferación o muerte de células que secretan receptores solubles, alteren los niveles normales de estas proteínas. Alternativamente, las alteraciones en los niveles de receptores solubles podrían desempeñar, ellas mismas, un rol en la fisiopatología de enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, suero y orina de animales y humanos presentan, normalmente, pequeñas concentraciones de sIL-2R. Sin embargo, en una gran variedad de enfermedades neoplásicas, autoinmunes, virales y parasitarias se han observado aumentos de hasta 100 veces en la concentración de sIL-2R. Otro ejemplo de esta expresión diferencial de receptores solubles lo constituyen los receptores solubles de TNF- α , que han sido encontrados en orina de individuos normales y en suero de pacientes con distintos tipos de cáncer, pero no en suero de individuos normales. Es posible que la presencia de receptores solubles en el suero de estos pacientes sea un mecanismo mediante el cual las células tumorales se protejan de los efectos tóxicos de TNF (Fernandez-Botran, R., 1991). En nuestro trabajo, cuando se analizaron los niveles de ARNm de las distintas variantes de *splicing* de T β RII por RT-PCR en líneas celulares y en cultivos primarios de células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo, se encontró que el ARNm de la nueva variante de T β RII está ausente sólo en líneas celulares derivadas de tumores sólidos. Este resultado se amplió mediante el análisis de los mismos ARNm en las mismas líneas celulares por RT-qPCR. Esta técnica cuantitativa confirmó que los niveles del ARNm de seT β RII son extremadamente bajos en líneas celulares derivadas de tumores sólidos humanos (entre 100 y 590 veces más bajos que los niveles de ARNm de T β RII). La posibilidad de que estos resultados pudieran aportar datos que permitan comprender mejor distintos aspectos de enfermedades tumorales humanas debería ser estudiada con más detalle en el futuro.

Respecto al análisis de las variantes de *splicing* de T β RII realizado en líneas celulares es importante mencionar, también, que en la línea HEK-293 los niveles de ARNm encontrados tanto de T β RII como de T β RIIB son muy bajos. Este resultado está de acuerdo con observaciones previas (Ebner, R. *et al.*, 1993a; Ebner, R. *et al.*, 1993b) que indican que las células HEK-293 expresan niveles endógenos de T β RII muy bajos o indetectables. Nuestros resultados no sólo confirman niveles muy bajos de los ARNm de las dos variantes conocidas de T β RII, sino que también muestran niveles mayoritarios del ARNm de seT β RII.

TGF- β 1 es la isoforma que expresan, preferentemente, las distintas subpoblaciones de leucocitos (Li, M. O. *et al.*, 2006). Sin embargo, en un trabajo realizado por Szymkowiak, C. H.

et al. (2000) se propone que neutrófilos polimorfonucleares obtenidos a partir de sangre periférica humana pueden sintetizar y liberar TGF- β 2 en su forma activa. Los niveles de citoquina secretados a los sobrenadantes celulares aumentan más de tres veces cuando los neutrófilos son estimulados con acetato de forbol miristato o PMA (por sus siglas en inglés, *phorbol myristate acetate*). En estos sobrenadantes no se detectaron TGF- β 1 ni TGF- β 3. Por el contrario, en sobrenadantes de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), si bien se detectaron altos niveles de TGF- β aún en ausencia de estimulación, no se pudo detectar a la isoforma TGF- β 2. Estos autores explican que las detecciones de TGF- β 1 en sobrenadantes de neutrófilos realizadas en otros trabajos (Grotendorst, G. R. *et al.*, 1989; Fava, R. A. *et al.*, 1991) podrían deberse a contaminaciones provenientes del suero usado para el cultivo de las células, que se sabe contiene cantidades significativas de esta isoforma de TGF- β , o a que la población de neutrófilos usada no era completamente pura sino que contenía un pequeño porcentaje de PBMC responsables de la liberación TGF- β 1. Los patrones específicos de las distintas variantes de *splicing* de T β RII que hemos encontrado en granulocitos y en linfocitos de individuos sanos están en concordancia con esos resultados. Por un lado, el hecho de que en granulocitos T β RIIB sea el receptor mayoritario podría explicarse por la necesidad de esta subpoblación sanguínea de responder a la única isoforma de TGF- β que es capaz de sintetizar y liberar al medio extracelular (Szymkowiak, C. H. *et al.*, 2000). Como ya se ha mencionado, debido a la baja afinidad entre TGF- β 2 y T β RII (Lin, H. Y. *et al.*, 1995), una vía alternativa para que esta isoforma de TGF- β lleve a cabo su señalización celular es a través de T β RIIB (Rotzer, D. *et al.*, 2001; del Re, E. *et al.* 2004). Por otro lado, se encontró un predominio de los niveles de ARNm de T β RII, frente a los de las otras dos variantes del receptor, en linfocitos. Este resultado concuerda con que los linfocitos, que son la subpoblación mayoritaria dentro de las PBMC (representan aproximadamente el 85 %), tienen que estar preparados para responder a TGF- β 1 o a TGF- β 3 pero no a TGF- β 2, ya que esta isoforma no fue detectada en los sobrenadantes de estas células (Szymkowiak, C. H. *et al.*, 2000). En cuanto a la variabilidad observada en el perfil de ARNm de las distintas variantes de T β RII en monocitos, podría indicar que en esta subpoblación existe una regulación en la expresión de los receptores según los requerimientos celulares o la disponibilidad de las diferentes isoformas de TGF- β .

Debido a que los perfiles de los ARNm de las variantes de T β RII encontrados en granulocitos y linfocitos de individuos sanos no se conservan en las mismas poblaciones leucocitarias de individuos con AR, se podría suponer que en esta enfermedad algunos componentes de la vía de señalización de TGF- β se encuentran alterados. Varios estudios sostienen esta hipótesis. Szekanecz, Z. *et al.* (1995) encontraron una regulación positiva en la expresión de TGF- β 1 en células endoteliales, macrófagos intersticiales y en células del revestimiento del tejido sinovial en AR, comparada con la de tejido sinovial normal o en osteoartritis. Por este motivo, propusieron que TGF- β 1 actuaría como un potente regulador de los eventos inflamatorios, fibróticos y angiogénicos en el tejido sinovial en AR. Por otro lado, niveles séricos aumentados

de TGF- β 1 en AR se correlacionan con el daño articular en la enfermedad y reflejarían el desarrollo de la inflamación autoinmune (Mieliauskaite, D. *et al.*, 2009). También se ha propuesto que el polimorfismo en TGF- β 1 determinaría la progresión de la destrucción articular en AR (Kim, S. Y. *et al.*, 2004). Estos resultados no son inesperados ya que se han demostrado alteraciones de esta vía en otras enfermedades autoinmunes como diabetes tipo I y esclerosis múltiple y en otros tipos de enfermedades humanas como cánceres, aterosclerosis, asma y enfermedades infecciosas causadas por parásitos, bacterias y virus (Li, M. O. *et al.*, 2006).

Como consecuencia de la complejidad de la patogénesis de la AR y de la heterogeneidad en las manifestaciones y severidad de la enfermedad, existe una gran variabilidad en la respuesta que los pacientes tienen frente a los tratamientos. El biomarcador ideal de la respuesta al tratamiento debería presentar gran disponibilidad, ser fácilmente evaluado, preciso, reproducible y barato. La evaluación de la asociación entre la expresión de genes y la actividad de la enfermedad podría ser útil para el monitoreo de la actividad de la enfermedad y para determinar la efectividad de tratamientos, por ejemplo, con metotrexato (MTX) (Halilova, K. I. *et al.*, 2012). En un estudio realizado por Constantin, A. *et al.* (1998) se observó un aumento significativo en la expresión génica de IL-4 e IL-10 en PBMC de pacientes con AR, comparada con la de controles sanos, luego de la exposición *in vitro* a MTX, mientras que la expresión génica de IL-2 y IFN- γ disminuyó significativamente. Otro trabajo mostró un aumento en la liberación de IL-1 β por PBMC de pacientes con AR que habían presentado una buena respuesta a MTX (Seitz, M. *et al.*, 2003). También ha sido demostrado que la terapia con MTX produce el aumento en la expresión de 11 genes y la disminución en la expresión de otros 26 genes (Galligan, C. L. *et al.*, 2007). Con respecto a las terapias biológicas contra la AR, existe una característica sistemática común a todas ellas que es la presencia de un grupo considerable de pacientes que no muestran una mejoría clínica significativa. Por lo tanto, uno de los principales objetivos en este campo de investigación es la identificación de biomarcadores que puedan servir de guía en la elección de la terapia más adecuada para cada paciente. Esto no sólo beneficiaría al paciente, sino que también reduciría considerablemente la carga socioeconómica de las enfermedades reumáticas (Julià, A. *et al.*, 2009). En este sentido, en un estudio se encontró que el aumento en la expresión del gen *ARG1* en células de sangre periférica de pacientes con AR se asocia significativamente con una peor respuesta al tratamiento con Rituximab, un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido contra CD20. También se observó que la sobreexpresión del gen *TRAF1* está asociada con una respuesta favorable al tratamiento con Rituximab. Por otro lado, el aumento en la expresión de TLR4 encontrado en células T CD4⁺ de pacientes con buena respuesta a Rituximab podría sugerir un rol de la activación directa de células T CD4⁺ en la AR (Julià, A. *et al.*, 2009). Otro estudio realizado en pacientes con AR tratados con el mismo agente biológico mostró efectos únicos en los perfiles globales de expresión génica en el tejido sinovial de estos pacientes. Los genes

regulados negativamente por la terapia con Rituximab fueron genes de inmunoglobulinas y genes involucrados en quimiotaxis y activación de leucocitos, mientras que los genes regulados positivamente por esta terapia incluyen transcritos relacionados con el desarrollo celular, con la señalización de TGF- β y con la cicatrización de heridas. Estas observaciones fueron confirmadas, a nivel de ARNm y proteína, mediante ensayos de RT-qPCR e inmunohistoquímica (Gutierrez-Roelens, I. *et al.*, 2011). En otro trabajo más reciente se evaluaron indicadores genéticos de respuesta a los modificadores biológicos de TNF- α . En el estudio, que incluyó 2706 pacientes con AR tratados con una de tres drogas anti-TNF (Etanercept, Infliximab o Adalimumab), el resultado más significativo se restringió a los pacientes tratados con Etanercept. Los resultados sugieren que el genotipo o la expresión de CD84, un gen relativo a la inmunidad, podrían ser biomarcadores de la respuesta al tratamiento con Etanercept en individuos de ascendencia europea. Los datos predicen que la expresión de CD84 estaría asociada positivamente con la respuesta al tratamiento, es decir, una mayor expresión de CD84 se asocia con una mejor respuesta al tratamiento con Etanercept (Cui, J. *et al.*, 2013). Estos estudios sentarían las bases para el desarrollo de paneles de expresión de genes que podrían ser usados por los médicos clínicos en un futuro no tan lejano (Halilova, K. I. *et al.*, 2012). En este sentido, el aporte del trabajo desarrollado en esta tesis proviene de las correlaciones realizadas entre los niveles de ARNm de las distintas variantes de T β RII en las diferentes poblaciones leucocitarias de pacientes con AR y los parámetros clínicos y bioquímicos de la enfermedad. Se encontró que el índice DAS28 y dos de las determinaciones incluidas en su definición, número de articulaciones doloridas y número de articulaciones inflamadas, se correlacionan positivamente y de manera significativa con los niveles de ARNm de T β RII y T β RIIB en monocitos. Además, ESD se correlacionó positiva y significativamente con los niveles de ARNm de seT β RII en linfocitos. Respecto a las correlaciones negativas estadísticamente significativas, estas fueron entre los niveles de ARNm de T β RIIB en granulocitos y HAQ y VAS médico y entre los niveles de seT β RII en granulocitos y DAS28. Se pensó, entonces, en la posibilidad del empleo de alguno de los ARNm involucrados en las correlaciones estadísticamente significativas como nuevos biomarcadores de la enfermedad. Debido a que sólo para T β RIIB en monocitos se observó que sus niveles de ARNm se distribuyen en tres grupos que concuerdan con las tres categorías en las que se clasifica las AR según los valores de DAS28, se decidió profundizar en el desarrollo de un método diagnóstico de la enfermedad que incluya a este ARNm. El cálculo propuesto constituyó un método diagnóstico caracterizado por una sensibilidad de 0.78 y una especificidad de 1. Se debe recordar que para este análisis se descartó a uno de los voluntarios sanos participantes del estudio ya que presentaba osteoartritis. Esta condición, claramente, podría ser la razón del único falso positivo arrojado por el nuevo *test* propuesto. De hecho, una de las posibles causas para desarrollar osteoartritis es haber padecido, previamente, una artropatía inflamatoria como AR (Hill, J., 2006). Además, Parker, W. L. *et al.* (2007) han demostrado que T β RIIB se

expresan en condrocitos tanto de individuos sanos como con osteoartritis y que la sobreexpresión de esta isoforma del receptor produce un aumento de las respuestas a TGF- β en condrocitos. Es decir, T β RIIB juega un rol clave en la regulación de la vía de señalización de TGF- β en condrocitos y, por lo tanto, en la función de este tipo celular.

Actualmente, existe la necesidad de desarrollar nuevas estrategias bioinformáticas y mejores métodos estadísticos que puedan integrar los datos clínicos, genéticos y de otros biomarcadores para construir algoritmos válidos, útiles desde el punto de vista clínico, que permitan realizar una predicción precisa de la respuesta a los tratamientos contra la AR (Halilova, K. I. *et al.*, 2012). En nuestro trabajo, el cálculo de los dos índices predictivos utilizados en medicina clínica arrojó resultados alentadores respecto al nuevo *test* diagnóstico de AR propuesto. El índice predictivo de verdaderos positivos fue de 1, mientras que el índice predictivo de verdaderos negativos fue de 0.99. Si bien es necesario ampliar el número de muestras analizadas para confirmar la eficacia del *test* propuesto, en una primera instancia, parecería ser un excelente complemento de los actuales métodos diagnósticos y de determinación de la actividad y pronóstico de la AR.

Conclusiones y Perspectivas

1. Conclusiones

Se identificó una nueva variante de *splicing* del receptor tipo II de TGF- β . Su ARNm se detectó tanto en células humanas hematopoyéticas como en líneas celulares y en cultivos primarios de células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo.

El análisis *in silico* de la secuencia de la nueva variante de T β RII predijo que se trataría de una proteína soluble y secretable, hecho que se confirmó mediante su detección en sobrenadantes de células que la sobreexpresan.

Se demostró que seT β RII se comporta como un agonista de TGF- β 1; mientras que no se le encontraron funciones inhibitorias ni potenciadoras de los efectos de TGF- β 2.

El método de RT-qPCR confirmó la amplia distribución de T β RIIB en todos los tipos celulares analizados. Además logró detectar, aunque en bajos niveles, a la variante seT β RII en las líneas celulares A549, HT-1080 y Caco-2, resultado que no se había observado por RT-PCR.

Se demostró que el nuevo receptor mutante de T β RIIB, T β RIIB Δ c, es un receptor dominante negativo tanto de TGF- β 1 como de TGF- β 2, que antagoniza las funciones de estas citoquinas.

Se encontraron perfiles específicos de los niveles de ARNm de las distintas variantes de *splicing* de T β RII en granulocitos y en linfocitos de voluntarios sanos. En granulocitos T β RIIB es la variante mayoritaria, mientras que en linfocitos los mayores niveles de ARNm corresponden a T β RII. Estos patrones se vieron alterados en los mismos tipos celulares de pacientes con AR.

Sin importar el tipo de subpoblación sanguínea analizado ni si provienen de voluntarios sanos o con AR, siempre se encontró una expresión minoritaria del ARNm de seT β RII respecto a la de las otras dos variantes del receptor tipo II de TGF- β .

Se observó que los niveles relativos de ARNm de T β RIIB en monocitos de pacientes con AR aumentan conforme aumenta la actividad de la enfermedad y se distribuyen en tres grupos que concuerdan con las tres categorías en las que se clasifica la enfermedad según el índice DAS28. Por lo tanto, se propone el uso de los niveles de ARNm de T β RIIB en monocitos como un nuevo biomarcador de AR.

2. Perspectivas

El estudio y la caracterización de seT β RII, que actualmente se está llevando a cabo en nuestro laboratorio, permitirá conocer más acerca de la vía de señalización de TGF- β y comprender mejor las implicancias que este complejo sistema de citoquinas y receptores tiene en ciertas patologías humanas.

Se propone fusionar a seT β RII con la región Fc de la inmunoglobulina humana IgG1. Esto permitirá obtener mayores niveles de proteína que permitirán, a su vez, realizar estudios de interacción receptor soluble-ligando para obtener bases sólidas sobre la función del nuevo receptor soluble tipo II de TGF- β .

Debido a la correlación positiva encontrada entre los niveles de ARNm de T β RIIB en monocitos y DAS28 en pacientes con AR y a la correspondiente abundancia de este ARNm según los grupos de la enfermedad, se propone ampliar este estudio con un mayor número de muestras de pacientes para confirmar su potencial como biomarcador de AR.

Para poder explorar si los niveles de seT β RII en fluidos biológicos de pacientes con AR pueden ser utilizados con fines diagnósticos se propone desarrollar un *test* de ELISA específico para la detección de seT β RII. Para ello, se está generando un anticuerpo que reconozca sólo a la isoforma seT β RII, lo que se conseguirá mediante el empleo de la secuencia exclusiva de trece aminoácidos del extremo carboxilo terminal del receptor soluble.

Referencias bibliográficas

- Allen, J. B.; Manthey, C. L.; Hand, A. R.; Ohura, K.; Ellingsworth, L.; Wahl, S. M. Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor β . *J Exp Med*. 1990, **171**:231-47.
- Allen, J. B.; Wong, H. L.; Guyre, P. M.; Simon, G. L.; Wahl, S. M. Association of Circulating Receptor Fc γ RIII-positive Monocytes in AIDS Patients with Elevated Levels of Transforming Growth Factor- β . *J. Clin. Invest*. 1991, **87**:1773-1779.
- Andres, J. L.; Stanley, K.; Cheifetz, S.; Massagué, J. Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor- β . *J Cell Biol*. 1989, **109**:3137-3145.
- Anzano, M. A.; Roberts, A. B.; Sporn, M. B. Anchorage-independent growth of primary rat embryo cells is induced by platelet-derived growth factor and inhibited by type-beta transforming growth factor. *J. Cell. Physiol* 1986, **126**:312-318.
- Arnett, F. C.; Edworthy, S. M.; Bloch, D. A.; McShane, D. J.; Fries, J. F.; Cooper, N. S.; Healey, L. A.; Kaplan, S. R.; Liang, M. H.; Luthra, H. S.; *et al*. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988, **31**: 315-324.
- Ashcroft, G. S. Bidirectional regulation of macrophage function by TGF- β . *Microbes Infect*. 1999, **1**:1275-1282.
- Assoian, R. K.; Komoriya, A.; Meyers, C. A.; Miller, D. M.; Sporn, M. B. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* 1983, **258**:7155–7160.
- Baardsnes, J.; Hinck, C. S.; Hinck, A. P.; O'Connor-McCourt, M. D. T β R-II discriminates the high- and low-affinity TGF- β isoforms via two hydrogen-bonded ion pairs. *Biochemistry* 2009, **48**:2146-2155.
- Barcellos-Hoff, M. H.; Dix, T. A. Redoxmediated activation of latent transforming growth factor- β 1. *Mol. Endocrinol*. 1996, **10**:1077-1083.
- Bellone, G.; Aste-Amezaga, M.; Trinchieri, G.; Rodeck, U. Regulation of NK cell functions by TGF- β 1. *J Immunol*. 1995, **155**:1066-1073.
- Benveniste, E. N.; Kwon, J.; Chung, W. J.; Sampson, J.; Pandya, K.; Ping Tang, L. Differential modulation of astrocyte cytokine gene expression by TGF- β . *J. Immunol*. 1994, **153**:5210-5220.
- Berse, B.; Hunt, J. A.; Diegel, R. J.; Morganelli, P.; Yeo, K.; Brown, F.; Fava, R. A. Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor- β (TGF- β) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol*. 1999, **115**:176-82.
- Blom, N.; Gammeltoft, S.; Brunak, S. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology* 1999, **294**(5): 1351-1362.
- Brand, T.; MacLellan, W. R.; Schneider, M. D. A Dominant-negative Receptor for Type β Transforming Growth Factors Created by Deletion of the Kinase Domain. *J. Biol. Chem*. 1993, **268**:11500-11503.
- Brandes, M. E.; Mai, U. E.; Ohura, K.; Wahl, S. M. Type I transforming growth factor- β receptors on neutrophils mediate chemotaxis to transforming growth factor- β . *J Immunol*. 1991a, **147**:1600-1606.

- Brandes, M. E.; Allen, J. B.; Ogawa, Y.; Wahl, S. M. TGF- β 1 suppresses acute and chronic arthritis in experimental animals. *J. Clin. Invest.* 1991b, **87**:1108-1113.
- Brennan, F.; Beech, J. Update on cytokines in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2007, **19**:296-301.
- Brown, C. B.; Boyer, A. S.; Runyan, R. B.; Barnett, J. V. Requirement of type III TGF- β receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* 1999, **283**:2080-2082.
- Byrn, R. A.; Mordenti, J.; Lucas, C.; Smith, D.; Marsters, S. A.; Johnson, J. S.; Cossum, P.; Chamow, S. M.; Wurm, F. M.; Gregory, T.; Groopman, J. E.; Capon, D. J. Biological properties of a CD4 immunoadhesin. *Nature* 1990, **344**:667-670.
- Capon, D. J.; Chamow, S. M.; Mordenti, J.; Marsters, S. A.; Gregory, T.; Mitsuya, H.; Byrn, R. A.; Lucas, C.; Wurm, F. M.; Groopman, J. E.; Broder, S.; Smith, D. H. Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy. *Nature* 1989, **337**:525-531.
- Cárcamo, J.; Zentella, A.; Massagué, J. Disruption of transforming growth factor beta signaling by a mutation that prevents transphosphorylation within the receptor complex. *Mol Cell Biol* 1995, **15**:1573-1581.
- Cazac, B. B.; Roes, J. TGF- β receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity* 2000, **13**:443-451.
- Chang, H.; Brown, C. W.; Matzuk, M. M. Genetic Analysis of the Mammalian Transforming Growth Factor- β Superfamily. *Endocr Rev.* 2002 **6**:787-823.
- Chen, R. -H.; Ebner, R.; Derynck, R. Inactivation of the Type II Receptor Reveals Two Receptor Pathways for the Diverse TGF- β Activities. *Science* 1993, **260**:1335-1338.
- Chen, R. -H.; Derynck, R. Homomeric Interactions between Type II Transforming Growth Factor- β Receptors. *J Biol Chem.* 1994, **269**:22868-22874.
- Chen, W.; Jin, W.; Hardegen, N.; Lei, K. J.; Li, L.; Marinos, N.; McGrady, G.; Wahl, S. M. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003, **198**:1875-1886.
- Choi, M. E. Cloning and characterization of a naturally occurring soluble form of TGF-beta type I receptor. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1999, **276**:F88-F95.
- Chu, C. Q.; Field, M.; Abney, E.; Zheng, R. Q.; Allard, S.; Feldmann, M.; Maini, R. N. Transforming growth factor- β 1 in rheumatoid synovial membrane and cartilage/pannus junction. *Clin Exp Immunol.* 1991, **86**:380-386.
- Constantin, A.; Loubet-Lescoulié, P.; Lambert, N.; Yassine-Diab, B.; Abbal, M.; Mazières, B.; de Préval, C.; Cantagrel, A. Antiinflammatory and immunoregulatory action of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence of increased interleukin-4 and interleukin-10 gene expression demonstrated in vitro by competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Arthritis & Rheumatism* 1998, **41**:48-57.
- Cottrez, F.; Groux, H. Regulation of TGF- β response during T cell activation is modulated by IL-10. *J Immunol.* 2001, **167**:773-778.
- Cui, J.; Stahl, E. A.; Saevarsdottir, S.; Miceli, C.; Diogo, D.; et al. Genome-wide association study and gene expression analysis identifies CD84 as a predictor of response to etanercept therapy in rheumatoid arthritis. *PLoS Genet.* 2013, **9**:e1003394.

Daniel, W. W. Bioestadística. Base para el análisis de Las ciencias de la salud. 4a Edición. Méjico, Editorial Limusa, 2005.

De Crescenzo, G.; Hinck, C. S.; Shu, Z.; Zúñiga, J.; Yang, J.; Tang, Y.; Baardsnes, J.; Mendoza, V.; Sun, L.; López-Casillas, F.; O'Connor-McCourt, M.; Hinck, A. P. Three Key Residues Underlie the Differential Affinity of the TGF β Isoforms for the TGF β Type II Receptor. *J. Mol. Biol.* 2006, **355**:47-62.

de Visser, K. E.; Kast, W. M. Effects of TGF- β on the immune system: implications for cancer immunotherapy. *Leukemia* 1999, **13**:1188-1199.

del Re, E.; Babitt, J. L.; Pirani, A.; Schneyer, A. L.; Lin, H. Y. In the Absence of Type III Receptor, the Transforming Growth Factor (TGF)- β Type II-B Receptor Requires the Type I Receptor to Bind TGF- β 2. *J Biol Chem* 2004, **279**:22765-22772.

Derynck, R.; Choy, L. Transforming growth factor- β and its receptors. En Thomson, A. ed. The cytokine handbook, 3rd edn. San Diego, Academic Press, 1998.

Derynck, R.; Akhurst, R. J.; Balmain, A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet.* 2001, **29**:117-129.

Di Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C. W. InfoStat versión 2010. InfoStat Group, College of Agricultural Sciences, Nacional University of Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

Dull, T.; Zufferey, R.; Kelly, M.; Mandel, R. J.; Nguyen, M.; Trono, D.; Naldini, L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol.* 1998, **72(11)**:8463-8471.

Ebisawa, T.; Fukuchi, M.; Murakami, G.; Chiba, T.; Tanaka, K.; Imamura, T.; Miyazono, K. Smurf1 interacts with transforming growth factor- β type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem.* 2001, **276**:12477-12480.

Ebner, R.; Chen, R. H.; Shum, L.; Lawler, S.; Zioncheck, T. F.; Lee, A.; Lopez, A. R.; Derynck, R. Cloning of a type I TGF- β receptor and its effect on TGF- β binding to the type II receptor. *Science* 1993a, **260(5112)**:1344-1348.

Ebner, R.; Chen, R. H.; Lawler, S.; Zioncheck, T. F.; Derynck, R. Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF- β or activin. *Science* 1993b, **262(5135)**:900-902.

Edwards, D. R.; Leco, K. J.; Beaudry, P. P.; Atadja, P. W.; Veillette, C.; Riabowol, K. T. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in young and old human fibroblasts. *Exp Gerontol.* 1996, **31**:207-23.

Eickelberg, O.; Pansky, A.; Mussmanni, R.; Bihl, M.; Tamm, M.; Hildebrand, P.; Perruchoud, A. P.; Roth, M. Transforming Growth Factor- β 1 Induces Interleukin-6 Expression via Activating Protein-1 Consisting of JunD Homodimers in Primary Human Lung Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 1999, **274**:12933-12938.

Fadok, V. A.; Bratton, D. L.; Konowal, A.; Freed, P. W.; Westcott, J. Y.; Henson, P. M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 1998, **101**:890-898.

- Fan, X.; Valdimarsdottir, G.; Larsson, J.; Brun, A.; Magnusson, M.; Jacobsen, S. E.; Dijke, P.; Karlsson, S. Transient Disruption of Autocrine TGF- β Signaling Leads to Enhanced Survival and Proliferation Potential in Single Primitive Human Hemopoietic Progenitor Cells. *The Journal of Immunology* 2002, **(168)**:755-762.
- Fava, R. A.; Olsen, N. J.; Postlethwaite, A. E.; Broadley, K. N.; Davidson, J. M.; Nanney, L. B.; Lucas, C.; Townes, A. S. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues implications for TGF- β driven synovial inflammation and hyperplasia. *J Exp Med*. 1991, **173**:1121-1132.
- Fernandez-Botran, R. Soluble cytokine receptors: novel immunotherapeutic agents. *Exp Opin Invest Drugs* 2000, **9**:497-514.
- Firestein, G. S. Rheumatoid arthritis and spondyloarthropathy, rheumatoid synovitis and pannus. En Klippel, J. H.; Dieppe, P. A. Rheumatology. *St Louis*, 1994.
- Fontenot, J. D.; Rudensky, A. Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol*. 2005, **6**:331-337.
- Fransen, J.; Creemers, M. C.; van Riel, P. L. Remission in rheumatoid arthritis: agreement of the disease activity score (DAS28) with the ARA preliminary remission criteria. *Rheumatology* 2004, **43**:1252-1255.
- Franzén, P.; ten Dijke, P.; Ichijo, H.; Yamashita, H.; Schulz, P.; Heldin, C. H.; Miyazono, K. Cloning of a TGF- β type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF- β type II receptor. *Cell* 1993, **75**:681-692.
- Fräter-Schröder, M.; Müller, G.; Birchmeier, W.; Böhlen, P. Transforming growth factor-beta inhibits endothelial cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986, **137**:295-302.
- Frolik, C. A.; Dart, L. L.; Meyers, C. A.; Smith, D. M.; Sporn, M. B. Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, **80**:3676–3680.
- Galligan, C. L.; Baig, E.; Bykerk, V.; Keystone, E. C.; Fish, E. N. Distinctive gene expression signatures in rheumatoid arthritis synovial tissue fibroblast cells: correlates with disease activity. *Genes and Immunity* 2007, **8**:480-491.
- Gatza, C. E.; Oh, S. Y.; Blobel, G. C. Roles for the type III TGF- β receptor in human cancer. *Cell Signal*. 2010, **22**:1163-1174.
- Ge, G.; Greenspan, D. S. BMP1 controls TGF- β 1 activation via cleavage of latent TGF- β binding protein. *J. Cell Biol*. 2006, **175**:111-120.
- Giri, J. G.; Wells, J.; Dower, S. K.; McCall, C. E.; Guzman, R. N.; Slack, J.; Bird, T. A.; Shanebeck, K.; Grabstein, K. H.; Sims, J. E. Elevated levels of shed type II IL-1 receptor in sepsis: potential role for type II receptor in regulation of IL-1 responses. *J. Immunol*. 1994, **153**:5802-5809.
- Gorelik, L. Flavell, R. A. Abrogation of TGF- β signaling in T cell leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 2000, **12**:171-181.
- Gorelik, L. Flavell, R. A. Transforming growth factor- β in T-cell biology. *Nat Rev Immunol*. 2002, **2**:46-53.
- Govinden, R.; Bhoola, K. D. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- β . *Pharmacol Ther* 2003, **98**:257-265.

- Gray, J. D.; Hirokawa, M.; Ohtsuka, K.; Horwitz, D. A. Generation of an inhibitory circuit involving CD8⁺ T cells, IL-2, and NK cell-derived TGF- β : contrasting effects of anti-CD2 and anti-CD3. *J Immunol.* 1998, **160**:2248-2254.
- Gresham, H. D.; Ray, C. J.; O'Sullivan, F. X. Defective neutrophil function in the autoimmune mouse strain MRL/lpr. Potential role of transforming growth factor- β . *J Immunol.* 1991, **146**:3911-3921.
- Groppe, J.; Hinck, C. S.; Samavarchi-Tehrani, P.; Zubieta, C.; Schuermann, J. P.; Taylor, A. B.; Schwarz, P. M.; Wrana, J. L.; Hinck, A. P. Cooperative Assembly of TGF- β Superfamily Signaling Complexes Is Mediated by Two Disparate Mechanisms and Distinct Modes of Receptor Binding. *Molecular Cell* 2008, **29**:157-168.
- Grotendorst, G. R.; Smale, G.; Pencev, D. Production of transforming growth factor- β by human peripheral blood monocytes and neutrophils. *J Cell Physiol* 1989, **140**:396-402.
- Guimond, A.; Sulea, T.; Pen, A.; Ear, P.; O'Connor-McCourt, M. D. Site-directed mutagenesis of the type II TGF-beta receptor indicates a ligand-binding site distinct from that of the type II activin receptor. *FEBS Letters* 2002, **515**:13-19.
- Gutierrez-Roelens, I.; Galant, C.; Theate, I.; Lories, R. J.; Durez, P.; Nzeusseu-Toukap, A.; Van den Eynde, B.; Houssiau, F. A.; Lauwerys, B. R. Rituximab treatment induces the expression of genes involved in healing processes in the rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum.* 2011, **63**:1246-1254.
- Gutiérrez Dávila, J. M.; Roncancio Villamil, G. E. Artritis reumatoidea. En Rozo Uribe, R. Medicina Interna. Prácticas & procedimientos. Guía de práctica clínica. Tomo III. Primera edición. *Ediciones Médicas Latinoamericanas S. A., Bogotá, Colombia*, 2003.
- Halilova, K. I.; Brown, E. E.; Morgan, S. L.; Bridges Jr., S. L.; Hwang, M. -H.; Arnett, D. K.; Danila, M. I. Markers of Treatment Response to Methotrexate in Rheumatoid Arthritis: Where Do We Stand? *International Journal of Rheumatology* 2012, **2012**:978396.
- Han, J.; Hajjar, D. P.; Tauras, J. M.; Feng, J.; Gotto, A. M. Jr.; Nicholson, A. C. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and TGF- β 2 decrease expression of CD36, the type B scavenger receptor, through mitogen-activated protein kinase phosphorylation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *J Biol Chem.* 2000, **275**:1241-1246.
- Hart, P. J.; Deep, S.; Taylor, A. B.; Shu, Z.; Hinck, C. S.; Hinck, A. P. Crystal structure of the human T β R2 ectodomain-TGF- β 3 complex. *Nat Struct Biol.* 2002, **9**:203-208.
- Hawley, D. J.; Wolfe, F. Sensitivity to change of the Health Assessment Questionnaire (HAQ) and other clinical and health status measures in Rheumatoid Arthritis: results of short term clinical trials and observational studies versus long term observational studies. *Arthritis Care Res* 1992, **5**:130-136.
- Heaney, M. L.; Golde, D. W. Soluble Cytokine Receptors. *Blood* 1996, **87**:847-857.
- Hill, C.; Flyvbjerg, A.; Rasch, R.; Bak, M.; Logan, A. Transforming growth factor- β 2 antibody attenuates fibrosis in the experimental diabetic rat kidney. *J Endocrinol.* 2001, **170**:647-651.
- Hill, J. Rheumatology nursing: a creative approach. 2nd ed. *England, John Wiley & Sons, Ltd.* 2006.
- Hirai, R.; Fujita, T. A Human Transforming Growth Factor- β Type II Receptor That Contains an Insertion in the Extracellular Domain. *Exp Cell Res* 1996, **223**:135-141.

- Hogrefe, J. F.; Marengo, M. F.; Schneeberger, E. E.; Rosemffet, M.; Citera, G.; Maldonado Cocco, J. Valor de corte de HAQ para predecir discapacidad laboral en pacientes con artritis reumatoidea. *Rev Argent Reumatol* 2007, **18**(Supl1):138.
- Horiguchi, M.; Ota, M.; Rifkin, D. B. Matrix control of transforming growth factor- β function. *J. Biochem.* 2012, **152**:321-329.
- Huang, J. S.; Wang, Y. H.; Ling, T. Y.; Chuang, S. S.; Johnson, F. E.; Huang, S. S. Synthetic TGF- β antagonist accelerates wound healing and reduces scarring. *FASEB J* 2002, **16**:1269-1270.
- Isaka, Y.; Akagi, Y.; Ando, Y.; Tsujie, M.; Sudo, T.; Ohno, N.; Border, W. A.; Noble, N. A.; Kaneda, Y.; Hori, M.; Imai, E. Gene therapy by transforming growth factor- β receptor-IgG Fc chimera suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1999, **55**:465-475.
- Johansen, M. B.; Kiemer, L.; Brunak, S. Analysis and prediction of mammalian protein glycation. *Glycobiology* 2006, **16**:844-853.
- Julià, A.; Barceló, M.; Erra, A.; Palacio, C.; Marsal, S. Identification of candidate genes for rituximab response in rheumatoid arthritis patients by microarray expression profiling in blood cells. *Pharmacogenomics* 2009, **10**:1697-1708.
- Kaartinen, V.; Voncken, J. W.; Shuler, C.; Warburton, D.; Bu, D.; Heisterkamp, N.; Groffen, J. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- β 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nature Genet* 1995, **11**:415-421.
- Kaminski, N.; Allard, J. D.; Pittet, J. F.; Zuo, F.; Griffiths, M. J.; Morris, D.; Huang, X.; Sheppard, D.; Heller, R. A. Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:1778-1783.
- Kehrl, J. H.; Wakefield, L. M.; Roberts, A. B.; Jakowlew, S.; Alvarez-Mon, M.; Derynck, R.; Sporn, M. B.; Fauci, A. S. Production of transforming growth factor β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med.* 1986a, **163**:1037-1050.
- Kehrl, J. H.; Roberts, A. B.; Wakefield, L. M.; Jakowlew, S. B.; Sporn, M. B.; Fauci, A. S. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B-lymphocytes. *J. Immunol.* 1986b, **137**:3855-3860.
- Kekow, J.; Wachsman, W.; McCutchan, J. A.; Cronin, M.; Carson, D. A.; Lotz, M. Transforming growth factor β and noncytopathic mechanisms of immunodeficiency in human immunodeficiency virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, **87**:8321-8325.
- Kim, M. S.; Ahn, S. M.; Moon, A. In vitro bioassay for transforming growth factor-beta using XTT method. *Arch Pharm Res* 2002, **6**:903-909.
- Kim, S. Y.; Han, S. W.; Kim, G. W.; Lee, J. M.; Kang, Y. M. TGF- β 1 polymorphism determines the progression of joint damage in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2004, **33**:389-394.
- Kinne, R. W.; Bräuer, R.; Stuhlmüller, B.; Palombo-Kinne, E.; Burmester, G. R. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000, **2**:189-202.
- Komesli, S.; Vivien, D.; Dutartre, P. Chimeric extracellular domain of type II transforming growth factor (TGF)- β receptor fused to the Fc region of human immunoglobulin as a TGF- β antagonist. *Eur. J. Biochem.* 1998, **254**:505-513.
- Konrad, L.; Scheiber, J. A.; Völck-Badouin, E.; Keilani, M. M.; Laible, L.; Brandt, H.; Schmidt, A.; Aumüller, G.; Hofmann, R. Alternative splicing of TGF-betas and their high-affinity receptors

T β RI, T β RII and T β RIII (betaglycan) reveal new variants in human prostatic cells. *BMC Genomics* 2007, **8**:318.

Kulkarni, A. B.; Huh, C. G.; Becker, D.; Geiser, A.; Lyght, M.; Flanders, K. C.; Roberts, A. B.; Sporn, M. B.; Ward, J. M.; Karlsson, S. Transforming growth factor- β 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**:770-774.

Kulkarni, A. B.; Ward, J. M.; Yaswen, L.; Mackall, C. L.; Bauer, S. R.; Huh, C. G.; Gress, R. E.; Karlsson, S. Transforming growth factor- β 1 null mice. An animal model for inflammatory disorders. *Am J Pathol.* 1995, **146**:264-275.

Kwon, Y. J.; Kim, D. J.; Kim, J. H.; Park, C. G.; Cha, C. Y.; Hwang, E. S. Human cytomegalovirus (HCMV) infection in osteosarcoma cell line suppresses GM-CSF production by induction of TGF- β . *Microbiol Immunol.* 2004, **48**:195-199.

Lafyatis, R.; Thompson, N. L.; Remmers, E. F.; Flanders, K. C.; Roche, N. S.; Kim, S. J.; Case, J. P.; Sporn, M. B.; Roberts, A. B.; Wilder, R. L. Transforming growth factor- β production by synovial tissues from rheumatoid patients and streptococcal cell wall arthritic rats. Studies on secretion by synovial fibroblast-like cells and immunohistologic localization. *J Immunol.* 1989, **143**:1142-1148.

Landewé, R.; van der Heijde, D.; van der Linden, S.; Boers, M. Twenty-eight-joint counts invalidate the DAS28 remission definition owing to the omission of the lower extremity joints: a comparison with the original DAS remission. *Ann Rheum Dis* 2006, **65**:637-641.

Lázaro de Mercado, P.; Aguilar Conesa, M. D.; Carmona, L. Guía de Práctica Clínica para el Manejo de la Artritis Reumatoide en España. *Sociedad Española de Reumatología, España*, 2007.

Levine, S. J. Mechanisms of Soluble Cytokine Receptor Generation. *The Journal of Immunology* 2004, **173**:5343-5348.

Li, A. G.; Wang, D.; Feng, X-H.; Wang, X-J. Latent TGF- β 1 overexpression in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder. *EMBO J.* 2004, **23**:1770-1781.

Li, M. O.; Wan, Y. Y.; Sanjabi, S.; Robertson, A-K. L.; Flavell, R. A. Transforming Growth Factor- β Regulation of Immune Responses. *Annu Rev Immunol.* 2006, **24**:99-146.

Lin, H. Y.; Wang, X. F.; Ng-Eaton, E.; Weinberg, R. A.; Lodish, H. F. Expression cloning of the TGF- β type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 1992, **68**:775-785.

Lin, H. Y.; Moustakas, A.; Knaus, P.; Wells, R. G.; Henis, Y. I.; Lodish, H. F. The soluble exoplasmic domain of the type II transforming growth factor (TGF)- β receptor. A heterogeneously glycosylated protein with high affinity and selectivity for TGF- β ligands. *J Biol Chem.* 1995, **270**:2747-2754.

Lo, K. -M.; Sudo, Y.; Chen, J.; Li, Y.; Lan, Y.; Kong, S. -M.; Chen, L.; An, Q.; Gillies, S. D. High level expression and secretion of Fc-X fusion proteins in mammalian cells. *Protein Engineering* 1998, **6**:495-500.

López-Casillas, F.; Cheifetz, S.; Doody, J.; Andres, J. L.; Lane, W. S.; Massagué, J. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system. *Cell* 1991; **67**:785-795.

López-Casillas, F.; Wrana, J. L.; Massagué, J. Betaglycan presents ligand to the TGF β signaling receptor. *Cell* 1993, **73**:1435-1444.

Lotz, M.; Kekow, J.; Carson, D. A. Transforming growth factor- β and cellular immune responses in synovial fluids. *J Immunol.* 1990, **144**:4189-4194.

Luttmann, W.; Franz, P.; Matthys, H.; Virchow, J. C. Jr. Effects of TGF- β on eosinophil chemotaxis. *Scand J Immunol.* 1998, **47**:127-130.

Machold, K. P.; Stamm, T. A.; Nell, V. P.; Pflugbeil, S.; Aletaha, D.; Steiner, G.; Uffmann, M.; Smolen, J. S. Very recent onset rheumatoid arthritis: clinical and serological patient characteristics associated with radiographic progression over the first years of disease. *Rheumatology* 2007, **46**:342-349.

Maggard, M.; Meng, L.; Ke, B.; Allen, R.; Devgan, L.; Imagawa, D. K. Antisense TGF- β 2 immunotherapy for hepatocellular carcinoma: treatment in a rat tumor model. *Ann Surg Oncol* 2001, **8**:32-37.

Mäkinen, H.; Kautiainen, H.; Hannonen, P.; Sokka, T. Is DAS28 an appropriate tool to assess remission in rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 2005, **64**:1410-1413.

Maldonado Cocco, J.; Hofman, J. Revista Argentina de Reumatología. *Sociedad Argentina de Reumatología (SAR), Buenos Aires, Argentina*, 2008.

Maniatis, T.; Fritsch, E. F.; Sambrook, J. Molecular cloning. A laboratory manual. *New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press* 1982.

Massagué, J. The transforming growth factor- β family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1990, **6**:597-641.

Massagué, J.; Attisano, L.; Wrana, J. L. TGF- β family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* 1994, **4**:172-178.

Massagué, J.; Chen, Y-G. Controlling TGF- β signaling. *Genes Dev.* 2000, **14**:627-644.

Mazzarelli, P.; Scuderi, F.; Mistretta, G.; Provenzano, C.; Bartoccioni, E. Effect of transforming growth factor- β 1 on interleukin-6 secretion in human myoblasts. *J Neuroimmunol.* 1998, **87**:185-188.

McIntyre, T. M.; Kehry, M. R.; Snapper, C. M. Novel in vivo model for high-rate IgA class switching. *J. Immunol.* 1995, **154**:3156-3161.

Mieliauskaitė, D.; Venalis, P.; Dumalakiene, I.; Venalis, A.; Distler, J. Relationship between serum levels of TGF- β 1 and clinical parameters in patients with rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome secondary to rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 2009, **42**:356-358.

Miyazono, K.; Olofsson, A.; Colosetti, P.; Heldin, C. H. A role of the latent TGF- β 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF- β 1. *EMBO J.* 1991, **10**:1091-1101.

Moreland, L. W. Clinical and pharmacological experience with etanercept. *Expert Opin Investig Drugs* 1999, **8**:1443-1451.

Munger, J. S.; Huang, X.; Kawakatsu, H.; Griffiths, M. J.; Dalton, S. L.; Wu, J.; Pittet, J. F.; Kaminski, N.; Garat, C.; Matthay, M. A.; Rifkin, D. B.; Sheppard, D. The integrin α v β 6 binds and activates latent TGF- β 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 1999, **96**:319-328.

Munitz, A.; Levi-Schaffer, F. Eosinophils: 'new' roles for 'old' cells. *Allergy* 2004, **59**:268-275.

- Muraoka, R. S.; Dumont, N.; Ritter, C. A.; Dugger, T. C.; Brantley, D. M.; Chen, J.; Easterly, E.; Roebuck, L. R.; Ryan, S.; Gotwals, P. J.; Koteliansky, V.; Arteaga, C. L. Blockade of TGF- β inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. *J. Clin. Invest.* 2002, **109**:1551-1559.
- Nakamura, K.; Kitani, A.; Strober, W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+) CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β . *J Exp Med.* 2001, **194**:629-644.
- Novick, D.; Shulman, L. M.; Chen, L.; Revel, M. Enhancement of Interleukin 6 cytostatic effect on human breast carcinoma cells by soluble IL-6 receptor from urine and reversion by monoclonal antibody. *Cytokine* 1992, **4**:6-11.
- Ogawa, Y.; Schmidt, D. K.; Dasch, J. R.; Chang, R. J.; Glaser, C. B. Purification and characterization of transforming growth factor- β 2.3 and - β 1.2 heterodimers from bovine bone. *J Biol Chem.* 1992, **267**:2325-2328.
- Öklü, R.; Hesketh, R. The latent transforming growth factor β binding protein (LTBP) family. *Biochem. J.* 2000, **352**:601-610.
- Pal, S.; Schnapp, L. M. HIV-Infected Lymphocytes Regulate Fibronectin Synthesis by TGF β 1 Secretion. *The Journal of Immunology* 2004, **172**:3189-3195.
- Parker, W. L.; Finnson, K. W.; Soe-Lin, H.; Knaus, P.; Philip, A. Expression and function of T β RII-B, a variant of the type II TGF- β receptor, in human chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* 2007, **15**:442-453.
- Pear, W. S.; Miller, J. P.; Xu, L.; Pui, J. C.; Soffer, B.; Quackenbush, R. C.; Pendergast, A. M.; Bronson, R.; Aster, J. C.; Scott, M. L.; Baltimore, D. Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* 1998, **92**:3780-3792.
- Peters, M.; Jacobs, S.; Ehlers, M.; Vollmer, P.; Mullberg, J.; Wolf, E.; Brem, G.; Meyer zum Buschenfelde, K. H.; Rose-John, S. The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6. *J. Exp. Med.* 1996, **183**:1399-1406.
- Petersen, T. N.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 2011, **8**:785-786.
- Pinals, R. S.; Masi, A. T.; Larsen, R. A.; The Subcommittee for criteria of remission in Rheumatoid Arthritis of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary Criteria for clinical remission in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1981, **24**:1308-1315.
- Pincus, T.; Sokka, T. Quantitative measures for assessing rheumatoid arthritis in clinical trials and clinical care. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003, **17**:753-781.
- Prevoo, M. L.; van't Hof, M. A.; Kuper, H. H.; van Leeuwen, M. A.; van de Putte, L. B.; van Riel, P. L. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995, **38**:44-48.
- Radaev, S.; Zou, Z.; Huang, T.; Lafer, E. M.; Hinck, A. P.; Sun, P. D. Ternary Complex of Transforming Growth Factor- β 1 Reveals Isoform-specific Ligand Recognition and Receptor Recruitment in the Superfamily. *The Journal of Biological Chemistry* 2010, **285**:14806-14814.

- Ramey, D. R.; Raynauld, J. P.; Fries, J. F. The health assessment questionnaire 1992: Status and review. *Arthritis Care Res* 1992, **5**:119-129.
- Ranges, G. E.; Figari, I. S.; Espevik, T.; Palladino, M. A. Jr. Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor β and reversal by recombinant tumor necrosis factor α . *J Exp Med*. 1987, **166**:991-998.
- Reeves, W. B.; Andreoli, T. E. Transforming growth factor β contributes to progressive diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:7667-7669.
- Roberts, A. B.; Anzano, M. A.; Wakefield, L. M.; Roche, N. S.; Stern, D. F.; Sporn, M. B. Type β transforming growth factor: A bifunctional regulator of cellular growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985, **82**:119-123.
- Rook, A. H.; Kehrl, J. H.; Wakefield, L. M.; Roberts, A. B.; Sporn, M. B.; Burlington, D. B.; Lane, H. C.; Fauci, A. S. Effects of transforming growth factor β on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J Immunol*. 1986, **136**:3916-3920.
- Rose-John, S.; Heinrich, P. C. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem. J*. 1994, **300**:281-290.
- Rotzer, D.; Roth, M.; Lutz, M.; Lindemann, D.; Sebald, W.; Knaus, P. Type III TGF- β receptor-independent signalling of TGF- β 2 via T β RII-B, an alternatively spliced TGF- β type II receptor. *EMBO Journal* 2001, **20**:480-490.
- Russo, M. L.; Brown, D.; Lin, H. Y. The soluble transforming growth factor- β receptor: advantages and applications. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009, **41**:472-476.
- Sakaguchi, S. Naturally arising CD4⁺ regulatoty T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004, **22**:531-562.
- Sanford, L. P.; Ormsby, I.; Gittenberger-de Groot, A. C.; Sariola, H.; Friedman, R.; Boivin, G. P.; Cardell, E. L.; Doetschman, T. TGF β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF β knockout phenotypes. *Development* 1997, **124**:2659-2670.
- Schambach, A.; Bohne, J.; Chandra, S.; Will, E.; Margison, G. P.; Williams, D. A.; Baum, C. Equal potency of gammaretroviral and lentiviral SIN vectors for expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in hematopoietic cells. *Mol Ther*. 2006, **13**(2):391-400.
- Schlaak, J. F.; Pfers, I.; Meyer Zum Büschenfelde, K. H.; Märker-Hermann, E. Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies. *Clin Exp Rheumatol* 1996, **14**:155-162.
- Schlingensiepen, K. H.; Jaschinski, F.; Lang, S. A.; Moser, C.; Geissler, E. K.; Schlitt, H. J.; Kielmanowicz, M.; Schneider, A. Transforming growth factor- β 2 gene silencing with trabedersen (AP 12009) in pancreatic cancer. *Cancer Sci*. 2011, **102**:1193-200.
- Schluns, K. S.; Cook, J. E.; Le, P. T. TGF- β differentially modulates epidermal growth factor-mediated increases in leukemia-inhibitory factor, IL-6, IL-1 α and IL-1 β in human thymic epithelial cells. *J. Immunol*. 1997, **158**:2704-2712.
- Schull, M. M.; Ormsby, I.; Kier, A. B.; Pawlowski, S.; Diebold, R. J.; Yin, M.; Allen, R.; Sidman, C.; Proetzel, G.; Calvin, D.; Annunziata, N.; Doetschman, T. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992, **359**:693-699.

Schultz-Cherry, S.; Murphy-Ullrich, J. E. Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor- β secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J. Cell Biol.* 1993, **122**:923-932.

Scrivo, R.; Di Franco, M.; Spadaro, A.; Valesini, G. The immunology of rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2007, **1108**:312-322.

Seitz, M.; Zwicker, M.; Villiger, P. M. Pretreatment cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells and serum from patients with rheumatoid arthritis in different American College of Rheumatology response groups to methotrexate. *Journal of Rheumatology* 2003, **30**:28-35.

Shi, Y.; Massagué, J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003, **113**:685-700.

Siegel, P. M.; Massagué, J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003, **3**:807-821.

Smith, J. D.; Bryant, S. R.; Couper, L. L.; Vary, C. P. H.; Gotwals, P. J.; Kotliansky, V. E.; Lindner, V. Soluble Transforming Growth Factor- β Type II Receptor Inhibits Negative Remodeling, Fibroblast Transdifferentiation, and Intimal Lesion Formation But Not Endothelial Growth. *Circ. Res.* 1999, **84**:1212-1222.

Smith, M. D.; Slavotinek, J.; Au, V.; Weedon, H.; Parker, A.; Coleman, M.; Roberts-Thomson, P. J.; Ahern, M. J. Successful treatment of rheumatoid arthritis is associated with a reduction in synovial membrane cytokines and cell adhesion molecule expression. *Rheumatology* 2001, **40**:965-977.

Snapper, C. M.; Waegell, W.; Beernink, H.; Dasch, J. R. Transforming growth factor- β 1 is required for secretion of IgG of all subclasses by LPS-activated murine B cells in vitro. *J Immunol.* 1993, **151**:4625-4636.

Soriano, E. R.; Carrió, J. H.; Schpilberg, M.; Figar, S.; Imamura, P. M.; Cattogio, L. J. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in health management organization in Argentina. *Rheumatology* 2003, **42**(Suppl1):130.

Souchelnytskyi, S.; ten Dijke, P.; Miyazono, K.; Heldin, C. H. Phosphorylation of Ser165 in TGF- β type I receptor modulates TGF- β 1-induced cellular responses. *EMBO J.* 1996, **15**:6231-6240.

Spindler, A.; Bellomio, V.; Berman, A.; Lucero, E.; Baigorria, M.; Paz, S.; Garrone, N.; Torres, A. I.; Romano, O.; Carraccio, A.; Leal, O.; Bazzano, A.; Vazquez, D.; Pera, O.; Arquez, G.; Valdez, M.; Lazaro, H.; Rengel, S.; Acosta, E.; Santana, M. Prevalence of rheumatoid arthritis in Tucumán, Argentina. *J. Rheumatol* 2002, **29**:1166-1170.

Stewart, S. A.; Dykxhoorn, D. M.; Palliser, D.; Mizuno, H.; Yu, E. Y.; An, D. S.; Sabatini, D. M.; Chen, I. S.; Hahn, W. C.; Sharp, P. A.; Weinberg, R. A.; Novina, C. D. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *ARN* 2003, **9**(4):493-501.

Summers, K. L.; O'Donnell, J. L.; Heiser, A.; Highton, J.; Hart, D. N. Synovial fluid transforming growth factor β inhibits dendritic cell-T lymphocyte interactions in patients with chronic arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999, **42**:507-518.

Suzuki, C.; Murakami, G.; Fukuchi, M.; Shimanuki, T.; Shikauchi, Y.; Imamura, T.; Miyazono, K. Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 2002, **277**:39919-39925.

Suzuki, E.; Kapoor, V.; Cheung, H. -K.; Ling, L. E.; DeLong, P. A.; Kaiser, L. R.; Albelda, S. M. Soluble Type II Transforming Growth Factor- β Receptor Inhibits Established Murine Malignant Mesothelioma Tumor Growth by Augmenting Host Antitumor Immunity. *Clinical Cancer Research* 2004, **10**:5907-5918.

Symons, J. A.; Young, P. R.; Duff, G. W. Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 β precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**:1714-1718.

Szekanecz, Z.; Haines, G. K.; Harlow, L. A.; Shah, M. R.; Fong, T. W.; Fu, R.; Lin, S. J.; Rayan, G.; Koch, A. E. Increased synovial expression of transforming growth factor (TGF)- β receptor endoglin and TGF- β 1 in rheumatoid arthritis: possible interactions in the pathogenesis of the disease. *Clin immunol immunopathol* 1995, **76**:187-194.

Szymkowiak, C. H.; Csernok, E.; Reinhold, D.; Bank, U.; Gross, W. L.; Kekow, J. Neutrophils synthesize and activate TGF β 2. *Cytokine* 2000, **12**:397-400.

Taipale, J.; Miyazono, K.; Heldin, C. H.; Keski-Oja, J. Latent transforming growth factor- β 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF- β binding protein. *J Cell Biol.* 1994, **124**:171-181.

Thorbecke, G. J.; Shah, R.; Leu, C. H.; Kuruvilla, A. P.; Hardison, A. M.; Palladino, M. A. Involvement of endogenous tumor necrosis factor α and transforming growth factor β during induction of collagen type II arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, **89**:7375-7379.

Tridandapani, S.; Wardrop, R.; Baran, C. P.; Wang, Y.; Opalek, J. M.; Caligiuri, M. A.; Marsh, C. B. TGF- β 1 suppresses myeloid Fc gamma receptor function by regulating the expression and function of the common γ -subunit. *J Immunol.* 2003, **170**:4572-4577.

Turner, M.; Chantry, D.; Feldmann, M. Transforming growth factor β induces the production of interleukin 6 by human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 1990, **2**:211-216.

van der Heijde, D. M. Joint erosions and patients with early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1995, **34**(Suppl 2):74-78.

van Gestel, A. M.; Anderson, J. J.; van Riel, P. L.; Boers, M.; Haagsma, C. J.; Rich, B.; Wells, G.; Lange, M. L.; Felson, D. T. ACR and EULAR improvement criteria have comparable validity in rheumatoid arthritis trials. *J Rheumatol* 1999, **26**:705-711.

Wahl, S. M.; Hunt, D. A.; Wakefield, L. M.; McCartney-Francis, N.; Wahl, L. M.; Roberts, A. B.; Sporn, M. B. Transforming growth factor type β induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, **84**:5788-5792.

Wahl, S. M.; Allen, J. B.; Weeks, B. S.; Wong, H. L.; Klotman, P. E. Transforming growth factor β enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993a, **90**:4577-4581.

Wahl, S. M.; Allen, J. B.; Costa, G. L.; Wong, H. L.; Dasch, J. R. Reversal of the acute and chronic synovial inflammation by anti-transforming growth factor β . *J Exp Med.* 1993b, **177**:225-230.

Wakefield, L. M.; Smith, D. M.; Flanders, K. C.; Sporn, M. B. Latent transforming growth factor- β from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences. *J Biol Chem.* 1988, **263**:7646-7654.

Weiser, R.; Attisano, L.; Wrana, J. L.; Massagué, J. Signaling Activity of Transforming Growth Factor β Type II Receptors Lacking Specific Domains in the Cytoplasmic Region. *Mol. Cell. Biol.* 1993, **13**:7239-7247.

- Wipff, P. J.; Hinz, B. Integrins and the activation of latent transforming growth factor β 1 - an intimate relationship. *Eur. J. Cell Biol.* 2008, **87**:601-615.
- Wolfe, F.; Sharp, J. T. Radiographic outcome of recent-onset rheumatoid arthritis: a 19-year study of radiographic progression. *Arthritis Rheum.* 1998, **41**:1571-1582.
- Wrana, J. L.; Attisano, L.; Cárcamo, J.; Zentella, A.; Doody, J.; Laiho, M.; Wang, X. -F.; Massagué, J. TGF β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 1992, **71**:1003-1014.
- Wrana, J. L.; Tran, H.; Attisano, L.; Arora, K.; Childs, S. R.; Massagué, J.; O'Connor, M. B. Two distinct transmembrane serine/threonine kinases from *Drosophila melanogaster* form an activin receptor complex. *Mol Cell Biol.* 1994a, **14**:944-950.
- Wrana, J. L.; Attisano, L.; Wieser, R.; Ventura, F.; Massagué, J. 1994. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 1994b, **370**:341-347
- Yamamoto, H.; Ueno, H.; Ooshima, A.; Takeshita, A. Adenovirus-mediated Transfer of a Truncated Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Type II Receptor Completely and Specifically Abolishes Diverse Signaling by TGF- β in Vascular Wall Cells in Primary Culture. *J Biol Chem.* 1996, **271**:16253-16259.
- Yamashita, H.; ten Dijke, P.; Franzén, P.; Miyazono, K.; Heldin, C.H. Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.* 1994, **269**:20172-20178.
- Yang, Y.; Dukhanina, O.; Tang, B.; Mamura, M.; Letterio, J. J.; MacGregor, J.; Patel, S. C.; Khozin, S.; Liu, Z.; Green, J.; Anver, M. R.; Merlino, G.; Wakefield, L. M. Lifetime exposure to a soluble TGF- β antagonist protects mice against metastasis without adverse side effects. *J. Clin. Invest.* 2002, **109**:1607-1615.
- Yu, Q.; Stamenkovic, I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 2000, **14**:163-176.
- Zhang, Y. E. Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Res.* 2009, **19**:128-139.
- Zwaagstra, J. C.; Sulea, T.; Baardsnes, J.; Lenferink, A. E. G.; Collins, C.; Cantin, C.; Paul-Roc, B.; Grothe, S.; Hossain, S.; Richer, L. -P.; L'Abbé, D.; Tom, R.; Cass, B.; Durocher, Y.; O'Connor-McCourt, M. D. Engineering and Therapeutic Application of Single-Chain Bivalent TGF- β Family Traps. *Mol Cancer Ther* 2012, **11**:1477-1487.
- Zufferey, R.; Dull, T.; Mandel, R. J.; Bukovsky, A.; Quiroz, D.; Naldini, L.; Trono, D. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J. Virol.* 1998, **72**(12): 9873-9880.

Patentes

- 1) A truncated TGF- β receptor II isoform naturally produced by human cells. Authors: **Carrea, A.**; Rodriguez, T. M.; Velasco Zamora, J.; Dewey, R. A. Aceptado para su patentabilidad por Vinculación Tecnológica de CONICET y en etapa de redacción de patente provisoria a presentar en USA.
- 2) Método de diagnóstico de artritis reumatoidea con biomarcadores moleculares. Autores: **Carrea, A.**; Winter, U.; Velasco Zamora, J.; Dewey, R. A. Aceptado para su patentabilidad por Vinculación Tecnológica de CONICET y en etapa de redacción de solicitud de patente a presentar en Argentina.

Anexos

1. Medios de cultivo

Medio	Componentes	Concentración
LB (Luria Bertani)	Triptona	10 g/L
	Extracto de levadura	5 g/L
	NaCl	10 g/L
LB sólido	LB	Diluyente
	Ágar	15 g/L
DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) suplementado	Medio DMEM (Gibco, Life Technologies)	Diluyente
	Suero fetal bovino (SFB)	10 % v/v
	Penicilina	100 U/ml
	Estreptomicina	0.1 mg/ml
	L-glutamina	2 mM
RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado	Medio RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies)	Diluyente
	SFB	10 % v/v
	Penicilina	100 U/ml
	Estreptomicina	0.1 mg/ml
Medio para ensayo MTT	DMEM suplementado sin SFB	Diluyente
	Seroalbúmina bovina (BSA)	0.1 % p/v
	Transferrina	5 µg/ml
	Ácido selénico	5 ng/ml
Medio para criopreservar células eucariotas	SFB	Diluyente
	DMSO	10 % v/v

Los medios LB y LB sólido se emplearon para el cultivo bacteriano. Sus componentes se disolvieron en dH₂O, se llevaron a pH 7.0 y se esterilizaron por autoclave. En los casos en que se cultivaron bacterias portadoras de plásmidos con resistencia a ampicilina, se les agregó a los medios de cultivo ampicilina a una concentración de 100 mg·ml⁻¹. Ambos medios se conservaron a 4 °C hasta su uso.

Los demás medios se utilizaron para el cultivo o criopreservación de células eucariotas. Los medios en estado de polvo se disolvieron en agua calidad Milli-Q, se les agregó la cantidad necesaria de NaHCO₃, se llevaron al pH 7 y se esterilizaron por filtración. Luego de esto se suplementaron y se los mantuvo a 4 °C hasta ser usados. Previo a su uso se precalentaron a 37 °C.

Para el cultivo de hASC, el medio DMEM fue suplementado con suero humano en lugar de SFB.

2. Buffers y soluciones

Los *buffers* y soluciones empleados en trabajos con cultivos bacterianos y plásmidos, en cultivo y aislamiento de células eucariotas y en corridas electroforéticas de ADN se prepararon en dH₂O, a menos que se especifique otro diluyente.

Los *buffers* y soluciones empleados en corridas electroforéticas de proteínas y en inmunoprecipitación e inmunoensayos se prepararon en agua calidad Milli-Q, a menos que se especifique otro diluyente.

Buffers y soluciones empleados en trabajos con cultivos bacterianos y plásmidos:

Buffer/solución	Componentes	Concentración	Preparación y conservación
TSS-2X (solución para resuspendido de bacterias competentes)	LB PEG ₈₀₀₀ DMSO MgCl ₂	Diluyente 20 % p/v 10 % v/v 70 mM	Esterilizar por filtración. Conservar a -20 °C.
P1 (<i>buffer</i> de resuspensión)	Tris-HCl, pH 8.0 EDTA RNAsa A	50 mM 10 mM 100 µg/ml	Esterilizar por autoclave. Agregar RNAsa A y conservar a 2-8 °C.
P2 (<i>buffer</i> de lisis)	NaOH SDS	200 mM 1 % p/v	Esterilizar por autoclave. Conservar a 15-25 °C.
P3 (<i>buffer</i> de neutralización)	Acetato de potasio	3.0 M	Ajustar a pH 5.5 con ácido acético glacial. Esterilizar por autoclave. Conservar a 15-25 °C ó 2-8 °C.

Buffers y soluciones empleados en corridas electroforéticas:

Buffer/solución	Componentes	Concentración	Preparación y conservación
Geles de agarosa	<i>Buffer</i> TBE 0.5X Agarosa Bromuro de etidio	Diluyente 0.8 ó 1.5 % p/v 0.5 µg/ml	Agregar la agarosa al <i>buffer</i> TBE y calentar para disolverla. Conservar a 15-25 °C. Agregar el bromuro de etidio antes de usar.
Buffer de siembra de ADN 5X	Azul de bromofenol Xilen-cianol EDTA Glicerol	0.15 % p/v 0.10 % p/v 50 mM 50 % v/v	Conservar a 4 °C.
Tris-Borato (TBE) 5X	Tris-base Ácido Bórico EDTA, pH 8.0	54 g/L 27.5 g/L 0.01 M	Conservar a 15-25 °C.

Bradford 5X	Coomassie brilliant blue G-250	0.5 mg/ml	Disolver el Coomassie en el etanol. Agregar el ácido y luego enrasar con agua. Conservar a 4 °C.
	Etanol (95 % v/v)	25 % v/v	
	H ₃ PO ₄ (85 % p/v)	50 % v/v	
Acrilamida 30 %	Acrilamida	292 g/L	Calentar a 37 °C para disolver. Conservar a 4 °C.
	Bis-acrilamida	8 g/L	
Buffer de separación para geles de acrilamida	Acrilamida 30 %	10 ó 15 % p/v	Preparar en el momento de hacer el gel.
	Tris-HCl (1.5 M, pH 8.8)	0.4 M	
	SDS	0.1 % p/v	
	Persulfato de amonio	0.2 % p/v	
	TEMED	0.8 µl/ml	
Buffer de stacking para geles de acrilamida	Acrilamida 30 %	5 % p/v	Preparar en el momento de hacer el gel.
	Tris-HCl (1.0 M, pH 6.8)	0.1 M	
	SDS	0.1 % p/v	
	Persulfato de amonio	0.2 % p/v	
	TEMED	1.2 µl/ml	
Buffer de siembra de proteínas 5X	Tris-base	60 mM	Previo al agregado del β-mercaptoetanol conservar a -20 °C. Una vez agregado, conservar a 15-25 °C hasta un mes.
	Glicerol	25 % v/v	
	SDS	2 % p/v	
	Azul de bromofenol	0.1 % p/v	
	β-mercaptoetanol	14.4 mM	
Buffer SDS-PAGE 1X	Tris-base	2.9 g/L	Ajustar pH a 8.2. Conservar a 4 °C.
	Glicina	14.4 g/L	
	SDS	0.01 % p/v	

Buffers y soluciones empleados en inmunoprecipitación y western-blot:

Buffer/solución	Componentes	Concentración	Preparación y conservación
Buffer de lisis hipotónico	Hepes	20 mM	Ajustar pH a 7.6. Conservar a 4 °C. El PIC (para lisados celulares) se agrega justo antes de usar.
	KCl	10 mM	
	MgCl ₂	1 mM	
	Glicerina	20 % p/v	
	Triton X-100	0.1 % v/v	
	Ditiotreitol	0.5 M	
	Na ₃ VO ₄	1 mM	
	Cocktail de inhibidores de proteasas (PIC,	1 µl/10 ⁶ células	

	Sigma-Aldrich, MO, USA)		
Buffer RIPA	Tris-HCl, pH 7.6	25 mM	Conservar a 4 °C.
	NaCl	150 mM	
	NP-40	1 % v/v	
	Deoxicolato de sodio	1 % p/v	
	SDS	0.1 % p/v	
Protein A/G PLUS-Agarose Immunoprecipitation Reagent (Santa Cruz Biotechnology)	-	-	Conservar a 4 °C.
Buffer de transferencia 1X	Tris-base	3 g/L	Conservar a 4 °C.
	Glicina	14.4 g/L	
	Metanol	20 % v/v	
Solución de lavado para <i>western-blot</i> (PBS-T)	PBS	Diluyente	Conservar a 15-25 °C ó 4 °C.
	Tween-20	0.1 % p/v	
Solución de bloqueo para <i>western-blot</i>	PBS-T	Diluyente	Conservar a 4 °C.
	Leche en polvo descremada	5 % p/v	
Solución de revelado	Agua	Diluyente	Conservar a 25 °C, en oscuridad.
	Revelador grano ultra fino PQ 7 (Romex)	25 % v/v	
Solución fijadora	Agua	Diluyente	Conservar a 25 °C, en oscuridad.
	Fijador ultra rápido ROMFIX (Romex)	25 % v/v	

Buffers y soluciones empleados en cultivo y aislamiento de células eucariotas:

Buffer/solución	Componentes	Concentración	Preparación y conservación
Buffer fosfato salino (PBS) 1X	NaCl	8 g/L	Ajustar pH a 7.4. Esterilizar por autoclave. Conservar a 4 °C.
	KCl	0.2 g/L	
	Na ₂ HPO ₄	1.44 g/L	
	KH ₂ PO ₄	0.24 g/L	
Tripsina	PBS	Diluyente	Esterilizar por filtración. Conservar a 4 °C ó -20 °C.
	Tripsina	2.5 mg/ml	
	EDTA	0.027 mM	
Tripsina-EDTA	Tripsina	Diluyente	Esterilizar por filtración. Conservar a 4 °C ó -20 °C.
	EDTA	1 mM	

Buffer hepes salino (HBS) 2X	Hepes	50 mM	Ajustar pH a 7.2. Conservar a 15-25 °C.
	NaCl	0.3 M	
	Na ₂ HPO ₄	1.5 mM	
Buffer de lisis de eritrocitos	KCl	0.6 M	Conservar a 15-25 °C.
Solución de fijado	PBS	Diluyente	Conservar a 15-25 °C.
	Cell Fix (BD Biosciences, Bélgica)	10 % v/v	
Buffer MACS	PBS, pH 7.2	Diluyente	Conservar a 4 °C.
	BSA	0.5 % p/v	
	EDTA	2 mM	

3. Kits comerciales

Kit	Compañía
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Alemania.
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Alemania.
Absolutely RNA[®] Miniprep Kit	STRATAGENE [®] , La Jolla, CA, USA.
SV Total RNA Isolation System	Promega, WI, USA.
Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare Life Sciences, UK.

4. Equipos

Dispositivo	Nombre, compañía
Baño termostático	Modelo MASSON, Vicking S.R.L., Argentina.
Bloque térmico	AccuBlock [™] Digital Dry Bath, Labnet International, Inc.
Vórtex	Vortex Genie-2, Scientific Industries SI.
Centrífugas	MiniSpin, Microcentrifuge 5415 R y Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Alemania.
	Sorvall RT6000B Refrigerate Centrifuge y Sorvall Instrument RC5C, Du Pont Company, USA.
Termocicladores	MyCycler [™] Thermal Cycler, Bio-Rad, USA.
Equipo qPCR	Mx3005P [™] , Stratagene, USA.
Cubas electroforéticas	Easy CASTTM Electrophoresis System. Modelo #B1A, Owl Scientific, Inc.
	GNA-200, Pharmacia Biotech.
	Mini-PROTEAN [®] Tetra System, Bio-Rad, USA.

Fuente de poder	2301 MacroDrive 1, LKB BROMMA.
Transiluminador UV	Hoefer MacroVue UV-20, Amersham Biosciences, USA.
Equipo para adquirir imágenes de geles	FOTO/Analyst Investigator, Fotodyne Incorporated, USA.
Espectrofotómetro	BioPhotometer, Eppendorf, Alemania.
Lector de placas de ELISA	Synergy H1 Hybrid Reader, BioTek Instruments, Inc.
Incubador celular	Water-Jacketed Incubator, Forma Scientific, USA.
Flujo laminar	NU-407-600 II, NUAIRE, USA.
Microscopio	TMS, Nikon, Japón.
Microscopio de fluorescencia	Diaphot Phase Contrast-2 ELWD 0.3, Nikon, Japón.
Citómetro de flujo	BD FACSCalibur™, BD, USA.
Separador MiniMACS	MiniMACS™ Separator, MACS MultiStand y MS Columns, Miltenyi Biotec GmbH, Alemania.

5. Programas informáticos

Programa	Uso
Vector NTI Advance TM 10, Invitrogen	Clonado y alineamiento de secuencias.
WinMDI	Análisis de datos de citometría de flujo.
OriginPro 8.5.1	Procesamiento de datos, análisis estadístico.
InfoStat	Análisis estadístico de datos de RT-qPCR.
Softwares del CBS (<i>Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark</i>)	Predicción de modificaciones postraduccionales.
OGPET v1.0 (Universidad de Texas)	Predicción de modificaciones postraduccionales.
SUMOplot™ (ABGENT, San Diego, CA, USA)	Predicción de modificaciones postraduccionales.
MxPro™ QPCR Software	Software asociado al equipo Mx3005P™.
PC Image	Software asociado al equipo FOTO/Analyst Investigator.
Gen5 2.00	Software asociado al equipo Synergy H1 Hybrid Reader.